

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Maud CHAPUT

PREMIÈRE THÈSE

Structure des mycosides C, peptidoglycolipides des mycobactéries

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 16 janvier 1965 devant la Commission d'examen

MM. CHOPIN

Président

LEDERER

MICHEL

} Examineurs

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Maud CHAPUT

PREMIÈRE THÈSE

Structure des mycosides C, peptidoglycolipides des mycobactéries

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le

devant la Commission d'examen

MM. CHOPIN

Président

LEDERER

} Examinateurs

MICHEL



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Doyens honoraires

MM. LONGCHAMBON, DOUIN, MOUSSA, GAUTHIER Henri.

Professeurs honoraires

MM. LOCQUIN, de LARAMBERGUE, SOLLAUD, MENTZER, MOUSSA, JAFFARD, DOUIN, Henri EYRAUD, DEJARDIN, VIRET.

Doyen

M. BRACONNIER.

Assesseurs

MM. MESNARD, BOLDIN.

Professeurs

MM. LONGCHAMBON	Minéralogie	MM. SARAZIN	Physique nucléaire
PRETTE	Chimie industrielle	BOLDIN	Microbiologie et Mycologie
COURTY	Chimie-Physique	PERES	Physiologie
KUHNER	Botanique	MESNARD	Electronique
MALECOT	Mécanique rationnelle et appliquée	GRANDMONTAGNE	Physique
PARIS	Chimie minérale	BOUTILLIER	Minéralogie
AUMERAS	Chimie	LAFOUCRIERE	Physique nucléaire théorique
COLONGE	Chimie organique	DREUX	Chimie organique
JANIN	Physique générale	TEICHNER	Chimie industrielle
FLANDRIN	Géologie appliquée	PAVANS DE CECCATTY	Zoologie
BERNARD	Physique industrielle	MERLIN	Chimie analytique
DUFAY Jean	Astronomie	DUFAY Maurice	Physique de l'Atmosphère
NIGON	Zoologie expérimentale	LUBET	Physiologie
GAUTHIER Henri	Géologie générale	PHILBERT	Physique nucléaire
WAUTIER	Zoologie	COHEN-ADAD	Chimie
CHOPIN	Chimie biologique	DAVID Louis	Géologie générale
CUEILLERON	Chimie	CHANEL	Psychophysiologie
BRACONNIER	Calcul différentiel et intégral	MAURY	Méthodes mathématiques de la Physique
EYRAUD Charles	Chimie-Physique appliquée	GAUTHIER Jean	Chimie
DEPRAZ	Physique nucléaire	GAUME	Physique expérimentale

Professeurs sans chaire

MM. FERON	Mathématiques
LAFORGUE	Physique
LEGAY	Zoologie expérimentale S. P. C. N.
UZAN	Physique S. P. C. N.
CHENEVOY	Géologie appliquée
GINET	Zoologie
ASCH	Physique
MICHEL Pierre	Minéralogie
DUCET	Biologie végétale
Mlle MAITROT	Physique
MM. GEVIN	Géologie générale
PONASSE	Mathématiques
d'INCAN	Physique
LEFEBVRE	Mathématiques
PERNET	Mathématiques
CHERY	Physique
BERGEON	Physique C. S. U.
Mlle GAUTHERON	Chimie biologique

Maîtres de Conférences

Mme ERICSON	Physique générale
MM. MARTEL	Mécanique
MATHIEU	Mécanique des Fluides
ERBEIA	Physique
DESCOTES	Chimie organique
PICARD Philippe	Mathématiques
LEMOIGNE	Botanique
DEMARCO	Géologie générale
MICHEL Georges	Biochimie
LEBRETON	Biologie végétale
DAVID Jean	Biologie animale
TOUSSET	Chimie propédeutique
FEUVRAIS	Physique Electricité
PICARD Claude	Mathématiques
SCHMITT	Physique M. P. C.
LAURENT	Chimie organique
ROT	Mathématiques
BETHOUX	Mathématiques
Mlle CALAIS	Mathématiques
GUSAKOW	Physique

Maître de Conférences adjoint

M. PIERRON Chimie

Conseiller Administratif

M. BURNET

Secrétaire Principal Honoraire

M. ROUX

- A Monsieur G. MICHEL

Maître de Conférences à la Faculté
des Sciences de Lyon.

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté Catholique des Sciences de Lyon, sous la direction de Monsieur le Professeur G. MICHEL. Je suis heureuse de lui exprimer ici toute ma gratitude pour les précieux conseils et encouragements qu'il m'a toujours prodigués.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à Monsieur le Professeur E. LEDERER pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et je le remercie également d'avoir bien voulu faire partie de mon Jury.

Je remercie Monsieur le Professeur J. CHOPIN d'avoir accepté la présidence de mon Jury.

Je tiens à remercier enfin mes camarades de Laboratoire pour les nombreux services qu'ils m'ont rendus.

INTRODUCTION

En 1957, Smith et coll. (1, 2, 3) ont mis en évidence la présence de constituants lipidiques spécifiques dans plusieurs types de mycobactéries. Une étude comparative de nombreuses souches tuberculeuses humaines, bovines, aviaires, saprophytes et atypiques a montré que certains composés se retrouvaient dans des souches appartenant à un même groupe et pouvaient être utilisés comme critères de classification des mycobactéries. Ces lipides ont été caractérisés par leur spectre infrarouge après purification chromatographique (4).

A l'exception du dimycocérosate de phtiocérol présent dans les souches humaines et bovines (5), les autres composés désignés primitivement par G ou J, sont des glycolipides qui contiennent des 6-désoxyhexoses caractéristiques (6).

Smith, Randall, Mac Lennan et Lederer ont proposé d'appeler ces substances "mycosides", un mycoside étant défini comme "a type specific glycolipid of mycobacterial origin" (7).

Le mycoside A (ancien "composé G_A"), est présent dans les souches atypiques photochromogènes (8, 9). Les sucres de ce glycolipide ont été identifiés par Mac Lennan aux 2-O-méthylfucose, 2-O-méthylrhamnose et 2, 4, di-O-méthylrhamnose (10).

Le mycoside B (ancien "composé G_B"), est caractéristique des souches bovines de *Mycobacterium tuberculosis* (2, 5). Il contient un seul ose, le 2-O-méthylrhamnose (10).

Les mycobactéries atypiques non photochromogènes, différentes souches de *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium marianum*, renferment un autre composé spécifique ; Le mycoside C. Ce dernier diffère très nettement des autres mycosides par la présence, dans sa molécule, d'acides aminés. Cette substance n'est pas homogène, c'est un mélange de peptidoglycolipides qui ont pu être séparés par chromatographies successives sur colonne d'acide silicique puis sur trisilicate de magnésium.

A partir des lipides de *Mycobacterium marianum*, nous avons isolé le mycoside C_m (11, 12), et dans deux souches de *Mycobacterium avium*, les mycosides C₂ (13).

L'étude structurale de ces composés fait l'objet de cette thèse.

Dans un premier chapitre, nous exposerons les données récentes sur la chimie des glycolipides des mycobactéries. Les techniques utilisées lors de nos travaux seront décrites dans le second chapitre. L'ensemble des résultats obtenus constituera les chapitres suivants.

CHAPITRE I

LES GLYCOLIPIDES DES MYCOBACTÉRIES

Avant d'aborder l'étude des mycosides C, nous décrirons brièvement les glycolipides des mycobactéries dont une mise au point a été publiée par Lederer en 1961 (14).

Les glycolipides des mycobactéries peuvent être classés en deux catégories : les glycolipides "vrais" contenant des sucres liés à une fraction lipidique et les peptidoglycolipides constitués de lipides, de sucres et d'acides aminés.

Les mycosides comprennent des glycolipides "vrais", *mycosides A et B* et des peptidoglycolipides : *mycosides C*.

Nous envisagerons d'abord la structure de ces différents composés puis nous étudierons leur activité biologique.

I - STRUCTURE DES GLYCOLIPIDES DES MYCOBACTERIES.

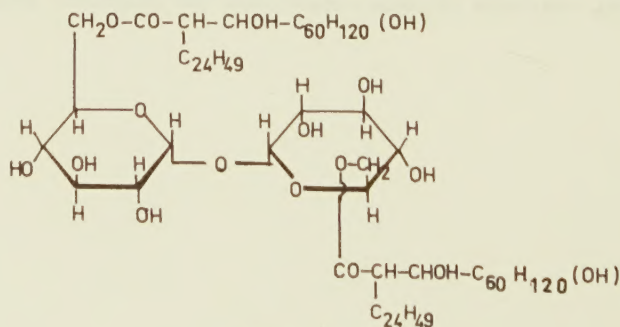
A - Glycolipides "vrais".

Les sucres trouvés dans ces substances sont des pentoses et des hexoses classiques liés soit par une liaison ester, soit par une liaison osidique.

1/ Cord-factor.

Considéré comme un des facteurs responsables de la virulence des mycobactéries, le cord-factor a été découvert par Bloch dans les souches humaines et bovines virulentes de *Mycobacterium tuberculosis*. Ce lipide toxique a d'abord été étudié par Bloch, Sorkin et Erlenmeyer (17, 18) puis par Bloch, Lederer et coll. (19, 20, 21).

Noll, Bloch, Asselineau et Lederer ont montré que ce glycolipide est un 6-6' dimycolate de α -D-tréhalose (22). Il possède la formule I.



formule I

Plusieurs mises au point de Lederer (14, 23) sur la chimie du cord-factor ont été publiées.

De nombreux esters de tréhalose ont été isolés de différentes souches de mycobactéries, ces composés diffèrent par la nature de l'acide mycolique. Ainsi Nojima a isolé du cord-factor à partir

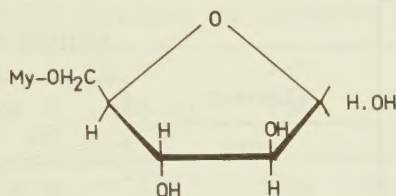
des cires D du B.C.G. (24). Dans un extrait lipidique de *Mycobacterium phlei*, Randall et Smith ont observé la présence d'un glycolipide toxique dont le spectre infrarouge est identique à celui du cord-factor (3). Dans la souche bovine *Marmorek* de *Mycobacterium tuberculosis*, Demarteau-Ginsburg et Lederer ont identifié un dimycolate et un monomycolate de tréhalose (25). Par ailleurs, dans les lipides de *Mycobacterium marianum*, Michel a caractérisé un dimycolate de tréhalose (26). De plus, Azuma et Yanamura ont isolé un 6, 6'-dimycolate de tréhalose, à partir de *Mycobacterium fortuitum* et de la souche P₁₆ d'une mycobactérie atypique ; dans cette dernière, les deux molécules d'acides mycoliques sont en C₆₈ (27, 28). D'autre part, dans les lipides de *Corynebacterium diphtheriae*, Pudles et coll. ont identifié un glycolipide contenant du tréhalose estérifié par une molécule d'acide corynomycolique et une molécule d'acide corynomycolénique (29). Récemment Vilkas et Rojas ont caractérisé un dipalmitate de tréhalose dans les lipides de *Mycobacterium fortuitum* ; comme dans le cord-factor, les acides gras estérifient le tréhalose en 6 et 6'(30).

2 - Glycolipides isolés des lipides liés.

Les lipides liés des mycobactéries ont été étudiés par Anderson et coll. Ces auteurs isolent dans les lipides des bacilles tuberculeux de souches humaines (31, 32), aviaires (33) et d'un bacille de la lèpre (34) des esters d'acides mycoliques avec un polyside contenant du D-galactose, D-arabinose et D-mannose.

D'autre part dans les lipides liés d'une souche humaine de *Mycobacterium tuberculosis*, Haworth, Kent et Stacey (35) ont mis en évidence la présence d'un polyside contenant les sucres suivants : D-arabinofuranose-, D-mannopyranose-, D-galactopyranose et D-glucosamine.

En 1962, Azuma et Yamamura (36) ont identifié un nouveau glycolipide dans une souche humaine du bacille tuberculeux (souche Aoyama B). C'est un monomycolate d'arabinose auquel les auteurs ont donné la formule 2 (37).



My = acide mycolique.

formule 2

Nous avons isolé également dans les lipides liés de *Mycobacterium marianum* un mycolate de D-arabinose dont la structure est en cours d'étude.

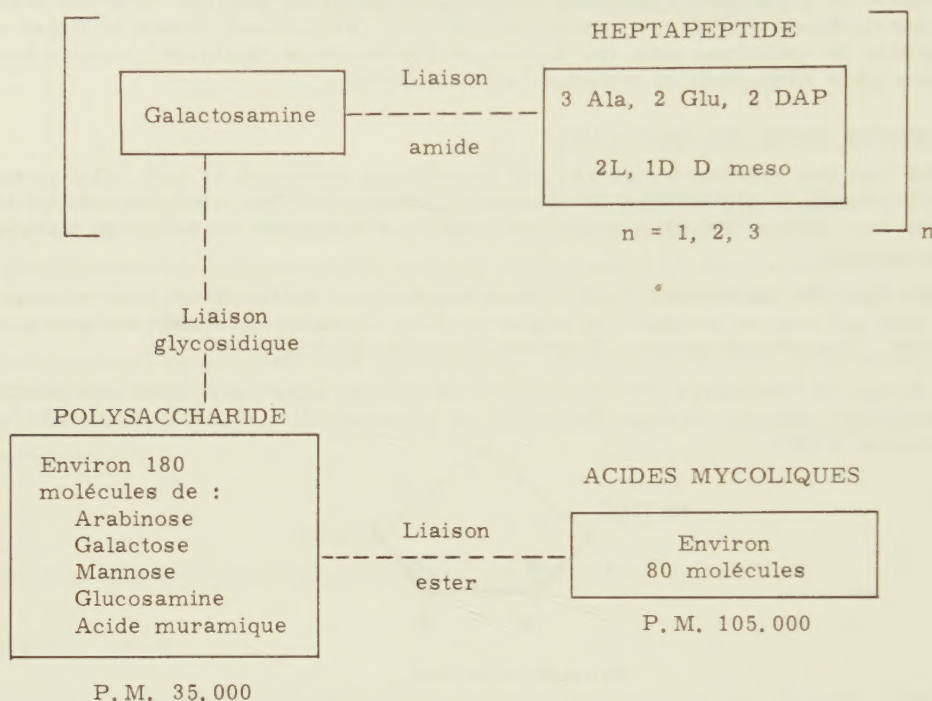
B - Peptidoglycolipides : cires D.

Les peptidoglycolipides sont surtout représentés par les cires D, fraction des lipides bactériens qui a fait l'objet de nombreuses études (38, 39). Ces cires ont été isolées dans différentes souches de mycobactéries par précipitation des graisses chloroformiques dans l'acétone bouillante (40).

Utilisant la technique d'Asselineau et Lederer (40), Demarteau-Ginsburg (25), a isolé les cires D de quatre souches bovines du bacille tuberculeux : B.C.G., Marmorek, Vallée et Dupré. Ces cires sont des glycolipides complexes comprenant un ester d'acide mycolique avec un oligoside formé d'arabinose, galactose et mannose. Ces trois oses sont également les constituants du polyside obtenu après saponification des cires D de *Mycobacterium smegmatis* étudiées par Barbier (41) ; dans *Mycobacterium phlei*, il a identifié le glucose.

Asselineau, Lederer et coll. (42) ont montré que les cires D des souches humaines étaient des peptidoglycolipides. Les trois acides aminés : alanine, acide glutamique et acide α - ϵ diaminopimélique se retrouvent dans toutes les souches mais en proportions variables. Dans le cas de la souche Brévannes, le dosage selon Moore et Stein donne les rapports molaires suivants : acide glutamique : 2, alanine : 3, acide α - ϵ diaminopimélique : 2. Le dosage microbiologique a montré que l'acide glutamique est entièrement sous la forme D, ainsi qu'une molécule d'alanine ; les deux autres étant sous la forme L. Ikawa et Snell ont précisé que l'acide α - ϵ diaminopimélique est l'isomère méso (43). Ces sept molécules d'acides aminés forment un heptapeptide (44).

Le polyoside renferme les oses suivants : D-galactose, D-mannose et les oses aminés : D-galactosamine, D-glucosamine et acide muramique. Il a été possible de démontrer la nature de deux liaisons existant entre la partie peptidique et la partie osidique, une première liaison se fait entre un groupement carboxyle de l'acide méso α - ϵ diaminopimélique et la galactosamine, celle-ci étant liée à une molécule de D-arabinose. D'autre part l'isolement d'un glycopeptide Ala-Glu contenant le D-arabinose et le D-galactose semble prouver l'existence d'une liaison ester entre un carboxyle de l'acide glutamique et un hydroxyle de l'un des sucres. Une structure hypothétique de la cire D des souches humaines est schématisée par la formule 3 (45).



Formule 3 - Structure hypothétique de la cire D de souches humaines. P.M. 140.000 (45).

Jusqu'à présent il semblait que seules les cires D des bacilles tuberculeux humains renferment des acides aminés. Or, récemment, un nouveau procédé de fractionnement a été mis au point par Jollès, Samour et Lederer (46). Ces auteurs soumettent à l'ultracentrifugation les solutions étherées de cires D provenant de souches bovines de *Mycobacterium tuberculosis* (Marmorek, Dupré) de la souche photochromogène atypique n° 4 (*M. Kansali*), de *Mycobacterium avium* et des souches saprophytes : *Mycobacterium smegmatis* et *Mycobacterium phlei* (47). Ils obtiennent deux fractions, l'une précipitant dans l'éther appelée fraction lourde "D_p", l'autre restant en solution appelée fraction légère "D_s". Le peptidoglycolipide caractéristique des souches humaines constitue la fraction D_p, la fraction D_s est exempte d'acides aminés.

Nous verrons en étudiant l'activité biologique des cires D que la fraction lourde D_p isolée de toutes les mycobactéries en quantité variable selon la souche, présente un intérêt au point de vue biologique.

Par ailleurs, il a été démontré que certains constituants des lipides complexes isolés des cires se retrouvent dans les parois cellulaires des mycobactéries. Cette similitude de composition a été signalée par Cummins et Harris (48). Ces auteurs ont étudié la paroi cellulaire de deux souches humaines du bacille tuberculeux, du B.C.G., de *Mycobacterium phlei* et de *Mycobacterium smegmatis*. Ils identifient les substances glucidiques suivantes : arabinose, galactose, mannose, glucosamine et acide muramique ; les acides aminés sont l'alanine, l'acide glutamique et l'acide α - ϵ diaminopimélique. Ces mêmes composés avaient été caractérisés par Kara et Keil (49), dans un filtrat de culture obtenu à partir des bacilles tuberculeux humains de la souche H₃₇R_v. Dans cette dernière, Foldès a obtenu le même glycopeptide avec, en plus, de l'acide aspartique (50). Récemment, l'acide muramique, isolé jusqu'ici des parois cellulaires, a été caractérisé par Samour (51), dans les cires D de la souche humaine H₃₇R_vS_r.

L'ensemble de ces résultats montre qu'il existe un étroit rapport biochimique entre les cires D et la paroi cellulaire des mycobactéries.

C - Mycosides.

Parmi ces lipides spécifiques, nous trouvons les *mycosides A et B*, glycolipides "vrais", et les *mycosides C*, peptidoglycolipides. Nous ne décrivons ici que les mycosides A et B, l'étude détaillée des mycosides C faisant l'objet de cette thèse.

Les composés A et B sont des glycolipides avec des 6-désoxyhexoses liés par une liaison osidique à une partie lipidique contenant un alcool aromatique.

Le spectre infrarouge montre la présence des bandes à 1610 cm^{-1} et 1510 cm^{-1} caractéristiques du noyau benzénique substitué.

1 - Mycoside A.

Le mycoside A est spécifique des mycobactéries atypiques photochromogènes (8, 9). Il contient le 2-O-méthylfucose, le 2-O-méthylrhamnose et le 2, 4-di-O-méthylrhamnose qui ont été identifiés par MacLennan et coll. (6, 10). La partie lipidique est un di-ou un trimycocérosate d'un alcool aromatique. Les propriétés physiques et les analyses élémentaires sont données dans le tableau 1.

Tableau 1
Propriétés physiques des mycosides A et B

Composés	C	H	N	(O)-CH ₃	PM	F	$[\alpha]_D^{20}$ (CHCl ₃ , c = 1)	λ_{max} (m μ) (hexane)
Mycoside A	72,6	10,8	0	8,6	1000	105°	-37°	222, 274, 281
Mycoside B	76,6	12,0	0	4,3	1000	25°	-22°	222, 274, 281

2 - Mycoside B.

C'est un composé caractéristique des souches bovines de *Mycobacterium tuberculosis* (2, 3, 5). Il a été étudié par Smith et coll. (4, 10), et par Demarteau-Ginsburg (52).

Ces auteurs ont montré que le mycoside B est un mélange de substances homologues qui diffèrent par la nature de leurs acides gras. Les résultats d'analyse élémentaire sont donnés dans le tableau 1.

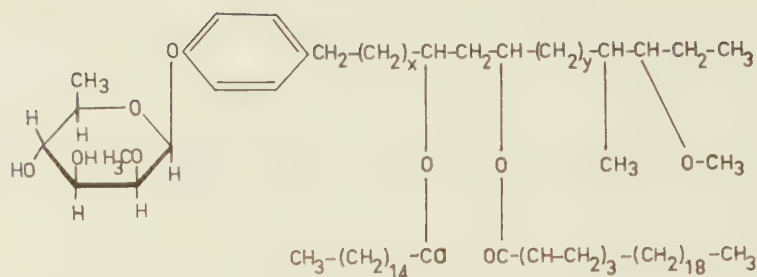
Demarteau-Ginsburg et Lederer ont étudié le mycoside isolé d'un extrait méthanolique de B.C.G. (52). La structure a été démontrée par l'analyse des produits obtenus après hydrolyse acide et hydrolyse alcaline.

L'hydrolyse acide donne une fraction lipidique et une fraction hydrosoluble qui contient un ose méthylé. Ce 6-désoxyhexose a été identifié au 2-O-méthylrhamnose par Mac Lennan et coll. (6, 10). Le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = -27^\circ$, indique qu'il s'agit du 2-O-méthyl-D-rhamnose (52, 53).

L'hydrolyse alcaline donne un mélange d'acides gras et une substance aromatique que les auteurs appellent "glycoside B". Soumis à une hydrolyse acide ce dernier donne d'une part le 2-O-méthyl-D-rhamnose, d'autre part, un composé aromatique appelé "phénol-glycol B".

L'interprétation des spectres U.V., I.R. et spectre de masse du phénol-glycol a montré que l'hydroxyle phénolique est lié au 2-O-méthyl-D-rhamnose par une liaison β -glycosidique ; les deux autres hydroxyles étant liés à une molécule d'acide mycocérosique et à une molécule d'acide palmitique comme le schématise la formule 4.

MYCOSIDE B



$$x + y = 16$$

formule 4

Le tableau 2 résume la distribution de quelques lipides complexes, dans différentes souches de mycobactéries.

Tableau 2

Souches	cord-factor	Mycoside A	Mycoside B	Mycoside C
<i>M. tuberculosis</i>				
v. hominis	+			
v. bovis	+		+	
<i>M. avium</i>				+
<i>M. fortuitum</i>	+			
<i>M. marianum</i>	+			
Atypiques :				
- photochromogènes (<i>M. kansasii</i>)		+		
- scotochromogènes				
- non photochromogènes				+
Saprophyte				
<i>M. phlei</i>	+			

II - PROPRIETES BIOLOGIQUES DES GLYCOLIPIDES DES MYCOBACTERIES.

Plusieurs mises au point ont été publiées sur l'activité biologique des lipides des mycobactéries. Citons en particulier celle d'Asselineau et Lederer en 1960 (54). Nous rappellerons brièvement quelques propriétés biologiques du cord-factor et des cires D.

A - Activité biologique du cord-factor.

Le cord-factor est un des facteurs responsables de la virulence des mycobactéries. La dose létale pour la souris est 15 µg mais l'injection répétée de plusieurs doses faibles est plus efficace qu'une seule injection avec une forte dose (55).

D'autre part, Kato et coll. (56, 57, 58) ont montré que l'injection intrapéritonéale de cord-factor à la souris (5 µg) entraîne une diminution de l'activité des déshydrogénases succinique, malique, lactique et glycérphosphorique du foie environ 24 heures après l'injection.

Il faut noter encore que le cord-factor inhibe la migration des leucocytes (59).

B - Cires D.

Elles agissent comme adjuvant immunologique. En effet, White, Bernstock, Johns et Lederer (60), ont constaté qu'une solution d'ovalbumine émulsionnée dans l'huile de paraffine et additionnée de cires D de souches humaines de *Mycobacterium tuberculosis* (souche Test, Canetti ou H₃₇R_v) produit chez le cobaye une forte augmentation d'anticorps anti-ovalbumine par rapport aux animaux traités par l'ovalbumine sans adjuvant. Ces auteurs avaient émis l'hypothèse d'une relation entre l'activité adjuvante (61, 62) des cires D des souches humaines et la présence d'une partie peptidique dans ces cires. En effet, les cires D isolées des souches bovines, aviaires ou saprophytes ne contenant pas d'acides aminés étaient inactives. Cette hypothèse a été confirmée récemment. Nous avons vu qu'un nouveau procédé de séparation appliqué aux cires D permet de caractériser des fractions "légères" sans azote et des fractions "lourdes" contenant des acides aminés. Il a été démontré que seules ces dernières fractions, présentes dans toutes les souches, étaient biologiquement actives (63).

D'autre part, Raffel (64), a montré que les cires D isolées des souches bovines ou humaines de *Mycobacterium tuberculosis* constituent le facteur responsable de l'hypersensibilité tuberculinique. Raffel a observé que les acides mycoliques libres ou le polyoside seul ou les deux en mélange étaient inactifs et il en a déduit que le facteur déterminant devait être l'ester d'un acide mycolique avec un polyoside (59). Là encore la nature de l'ose entrant dans la liaison n'intervient pas puisque des glycolipides synthétiques tels que le 1-mycolate de 2, 3, 4, 6-tétra-acétyl-D-galactose (65), ou le cord-factor sont également actifs ; il a été noté d'autre part que seuls les esters d'acides mycoliques étaient biologiquement actifs. Selon Raffel, les cires permettent à l'antigène l'entrée de certaines cellules de l'organisme animal où normalement il n'a pas accès (66).

De plus Delaunay et coll. (67) ont injecté au cobaye des suspensions dans du sérum physiologique de cires D des souches humaines ou bovines. Ils ont observé une réaction nécrotique persistante et la formation de cellules géantes.

C - Mycosides A et B.

L'activité des mycosides A et B n'est pas encore connue. Il semble qu'il existe une relation entre la forme de la colonie et la présence de ces glycolipides spécifiques. Dans le cas de la souche atypique photochromogène, *Mycobacterium Kansaii*, Smith et Fregnan (68), ont montré que la forme K de la colonie avait un rapport avec la présence du mycoside A.

CHAPITRE II

TECHNIQUES UTILISÉES

I - CHROMATOGRAPHIE.

A - Chromatographie sur colonne.

Elle est effectuée d'après la technique du chromatogramme liquide de Reichstein (69). Les adsorbants sont : l'alumine, le trisilicate de magnésium et l'acide silicique.

- L'alumine "Prolabo pour chromatographie" est traitée par HCl concentré, lavée à l'eau jusqu'à neutralité et activée par chauffage à 180°.

- Le trisilicate de magnésium, Zofingen (Suisse) est utilisé en mélange avec la célite. Nous l'avons préparé selon la méthode de Smith et Randall (4). Le mélange trisilicate-célite (2:1) est lavé à l'eau distillée bouillie jusqu'à pH 7, puis au méthanol et à l'éther. L'adsorbant est séché puis activé trente minutes à 150°.

- L'acide silicique Mallinckrodt en mélange avec la célite dans le rapport 2:1, est activé par chauffage à 110° pendant 16 à 24 heures.

Les solvants utilisés sont le chloroforme distillé et séché sur sulfate de sodium et le méthanol sur sodium.

B - Chromatographie sur papier.

- L'analyse qualitative des sucres et des amino-acides a été effectuée par chromatographie mono- et bi-dimensionnelle sur papier Whatman n° 1 ou n° 3 dans différents mélanges de solvants. Pour les acides aminés, le solvant le plus utilisé est le système : butanol-acide acétique-eau (65:10:25) et pour les sucres, le système : acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3). Les révélateurs sont la ninhydrine pour les acides aminés et le phtalate d'aniline pour les sucres réducteurs. Pour les sucres non réducteurs et les composés polyhydroxylés, nous avons appliqué la méthode de Cifonelli et Smith (70) basée sur l'oxydation périodique des glycols α .

- Les sucres, peptides et glycopeptides sont isolés par *chromatographie préparative sur papier*. On utilise le papier Whatman n° 3 et n° 3 MM. La solution à chromatographier, contenant 0,5 à 1 mg de substances à séparer, est déposée sur la ligne de départ en une succession de points espacés en 1 cm.

Après développement du chromatogramme on découpe deux bandes latérales A et B et une bande centrale C. La révélation de A, B, C par un réactif approprié fait apparaître les spots 1, 2 et 3. On découpe alors dans le chromatogramme les bandes correspondant à ces trois taches et on extrait les substances par élution.

Les différents éluats obtenus sont chromatographiés dans un deuxième solvant pour vérifier la pureté du produit isolé.

C - Chromatographie sur couches minces.

L'homogénéité des mycosides étudiés a été testée par chromatographie sur couches minces. Cette méthode analytique introduite en 1951 par Kirchner et coll. (71), a été modifiée par Reitsema (72, 73), en 1954, et mise au point par Stahl (74, 75).

Nous avons utilisé l'appareil Desaga (GmbH, Heidelberg, Allemagne) pour la préparation de couches adsorbantes d'épaisseur constante, 0,25 mm. Pour 10 plaques de 10 x 20 cm, on malaxe pendant 4 minutes 30 g de gel de silice avec 60 ml d'eau. Après séchage partiel à température ordinaire, les plaques sont activées par chauffage à 140° pendant 2 heures. On dépose 25 à 50 microgrammes de mycoside sur une droite à 2 cm de la base des plaques et à 2 cm du bord. On utilise la technique ascendante. Le solvant employé est le chloroforme en mélange avec 1 à 10 % de méthanol. La durée du développement est environ trente minutes.

Les différents composés sont localisés par pulvérisation d'une solution d'acide sulfurique à 50 %. Les spots apparaissent en jaune pâle sur fond blanc.

Pour la chromatographie préparative sur couches minces, nous utilisons des plaques de 20 x 20 cm et l'épaisseur de la couche adsorbante est 1 mm. La solution à chromatographier, contenant 2 à 5 mg de composé dissous dans le chloroforme, est déposée sur la ligne de départ en une succession de points espacés de 1 cm. Dans le solvant chloroforme-méthanol (96:4), la durée du chromatogramme est trente minutes. Après séchage à l'air, les spots sont localisés par révélation avec des vapeurs d'iode. La partie de chromatoplaque correspondant aux différentes taches est récupérée et la substance est extraite par le mélange chloroforme-méthanol (95:5).

II - TECHNIQUES ANALYTIQUES.

A - Analyse élémentaire.

Les analyses de C, H, N, (O)-CH₃ (selon Zeisel) (CO)-CH₃ (selon Kuhn et Roth) ont été effectuées au Laboratoire de microanalyse de l'Institut de Chimie des substances naturelles (Gif sur Yvette) et au laboratoire de microanalyse de la Ciba (Bâle)

B - Point de fusion.

Les points de fusion ont été déterminés au microscope à platine chauffante de Kofler.

C - Détermination spectrophotométriques.

Les spectres d'absorption infrarouge ont été réalisés avec un appareil Perkin-Elmer et les spectres d'absorption ultra-violette avec un spectrophotomètre Unicam.

Les dosages colorimétriques ont été effectués à l'aide du spectrophotomètre Spectral-Junior, Jouan.

D - Pouvoir rotatoire.

Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés avec le polarimètre électronique Roussel-Jouan.

III - TECHNIQUES DIVERSES.

A - Détermination du poids moléculaire selon la méthode de Barger et Rast (76, 77).

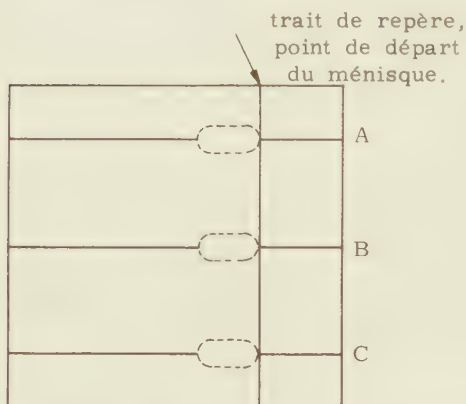
Cette méthode repose sur le principe suivant : quand, dans un capillaire, se trouvent deux solutions dont la tension de vapeur est différente, on note une augmentation de volume du côté de la solution où la pression osmotique est la plus grande.

Les capillaires utilisés, longs de 10 à 15 cm ont un diamètre de 0,5 à 1 mm. Ils sont fixés

sur des lames de verre placées dans une augette remplie d'eau, afin d'effectuer les mesures à température constante.

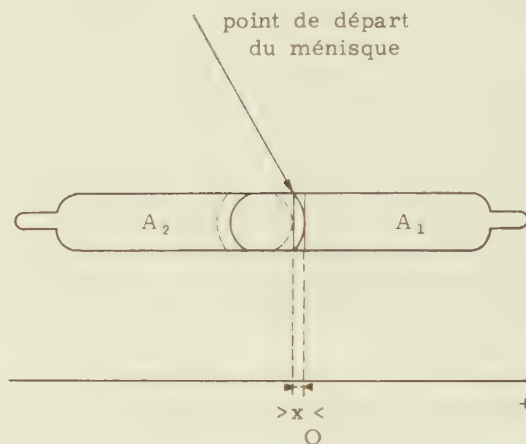
Croquis 1

Lame portant les capillaires A, B et C



Croquis 2

Capillaires A, B ou C



Chaque capillaire contient deux solutions séparées par une bulle d'air, la solution de la substance inconnue (A₁) et la solution de comparaison, solution de naphthalène dans le chloroforme (A₂). Le déplacement du ménisque, dû à l'augmentation ou à la diminution de volume, est déterminé à l'aide d'un comparateur micrométrique. Trois observations peuvent être faites :

- Augmentation de volume du côté de A₁. La concentration molaire de A₁ est alors supérieure à celle de A₂.
- Diminution de volume du côté de A₁, la concentration molaire de A₁ est inférieure à celle de A₂.
- Les volumes des deux solutions restent constants, A₁ et A₂ ont la même concentration molaire.

B - Dosage des acides aminés selon Moore et Stein (78).

Ce dosage est effectué sur Dowex 50 x 4. La résine lavée à l'eau distillée, à la soude normale puis une nouvelle fois à l'eau distillée, est tamponnée à pH 5,1, 0,2 N. Elle est introduite dans une colonne de diamètre 0,9 cm et de longueur 150 cm. par portions successives de 20 cm. La colonne est entourée d'une jaquette dans laquelle circule un courant d'eau maintenue à température constante. Le sommet de la colonne est mis en communication soit avec une ampoule contenant la solution de tampon adéquate, soit avec un dispositif permettant de réaliser un gradient de pH et de concentration ionique du liquide d'élution.

Un collecteur "Eral" permet de recueillir l'éluat par fractions de 1 à 10 ml grâce à une électrode mobile.

Certains dosages d'acides aminés ont été effectués selon Spackman et coll. (79) avec une autre résine, l'Amberlite CG 120. Le même appareillage est utilisé.

C. - Dessalification des solutions.

- Les solutions aqueuses d'acides aminés et de peptides ont été dessalifiées sur résines échangeuses d'ions soit Dowex 2, soit Dowex 50 x 2.

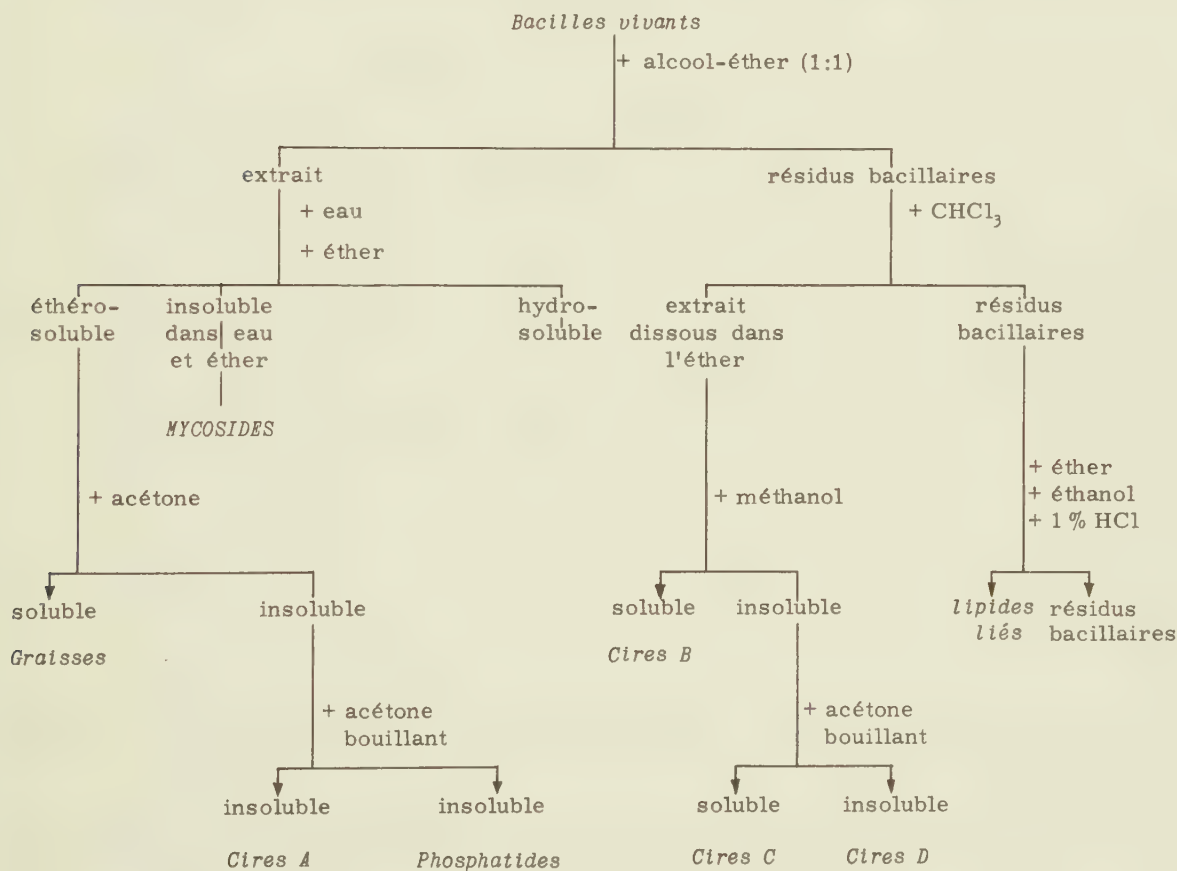
- La dessalification des solutions aqueuses de sucres obtenus après hydrolyses chlorhydriques ou saponification est effectuée par passage sur Amberlite MB₃.

IV - TECHNIQUES D'EXTRACTION DES BACILLES.

Nous avons utilisé le procédé d'extraction mis au point par Anderson (80) et modifié par Aebi et coll. (81). Le tableau 3 schématise l'ensemble des opérations.

Tableau 3

Fractionnement des lipides, selon Anderson (80) avec les modifications d'Aebi et coll. (81)



CHAPITRE III

LE MYCOSIDE C_m

I - ISOLEMENT ET PURIFICATION DU MYCOSIDE C_m.

L'extraction de *Mycobacterium marianum*, cultivé pendant 4 semaines sur milieu de Sauton, par le mélange alcool-éther (1:1), puis par le chloroforme, fournit 33 % de lipides totaux. Le tableau 4 indique leur répartition dans les différents groupes lipidiques (82).

Tableau 4
Teneur en lipides de *Mycobacterium marianum* (82)

	Culture n° 1		Culture n° 2	
	Poids en g.	% du poids sec	Poids en g.	% du poids sec
Graisses solubles dans l'acétone	188	14,4	165	14,7
Cires A	127	9,7	23	2,0
Phosphatide	15	1,1	3	0,3
Lipides éthersolubles	330	25,2	191	17,0
Cires B	21	1,6	47	4,2
Cires C	76	5,8	145	12,9
Cires D	7	0,5	7	0,6
Lipides chloroformiques	104	7,9	199	17,7
Lipides libres totaux	434	33,1	390	34,7
Résidu bacillaire	870		735	

L'extrait éthéro-alcoolique, après évaporation des solvants, donne une fraction insoluble dans l'éther et dans l'eau. Ces caractères de solubilité ont également été observés pour des composés peptidolipidiques isolés de *Nocardia asteroides* (83).

La substance insoluble dans l'éther est dissoute dans le chloroforme et la solution passée sur filtre Seitz, puis sur colonne de cellulose pour éliminer les amino-acides éventuels (84). Après évaporation du solvant, on obtient une substance incolore que l'on purifie par chromatographie sur colonne de trisilicate de magnésium. Le chloroforme élué 22 % du produit initial, le solvant chloroforme-méthanol (95:5) 54 %. Cette dernière fraction a été étudiée, c'est le mycoside C_m. La courbe d'élution est représentée sur la figure 1.

Le mycoside se présente sous l'aspect d'un solide incolore, F : 198-200°, [α]_D : - 31° (CHCl₃, c = 1,5), insoluble dans l'eau et dans l'éther, peu soluble à froid dans le méthanol et l'éthanol, très soluble dans le chloroforme et l'acide acétique glacial. Le spectre ultra-violet présente un maximum d'absorption à 264 mμ (ε = 1230 dans le chlorure de méthylène (figure 2).



Figure 1 - Courbe d'élution du mycoside C_m .

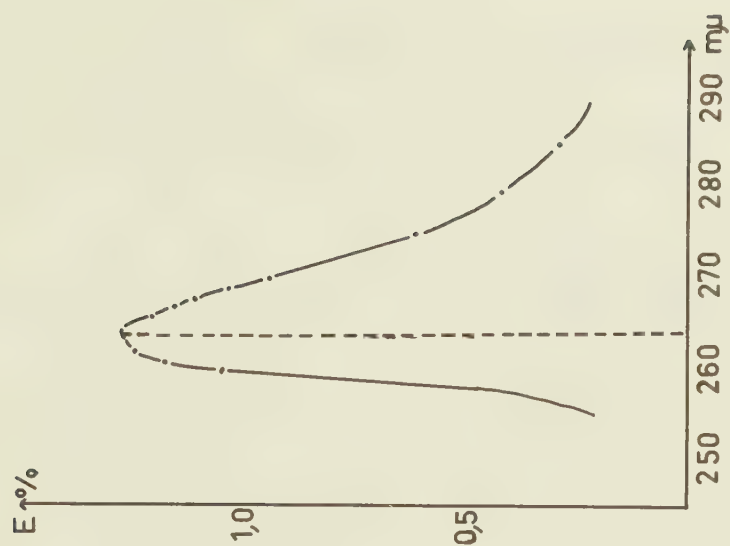


Figure 2 - Spectre d'absorption ultra-violette du mycoside C_m dans le chlorure de méthylène (Unicam).

Le spectre infrarouge possède les bandes correspondant à la liaison peptidique (3,10 et 6,17 μ) et au groupement acétyle (8,15 μ). (figure 3).

II - COMPOSITION ET NATURE DES CONSTITUANTS.

La recherche du phosphore et du soufre est négative. L'analyse élémentaire donne :

% C 64,65	H 8,70	N 4,70	(O)-CH ₃ 2,44	(CO)-CH ₃ 2,28
64,22	8,87	4,70	2,41	

Ces valeurs correspondent pour un poids moléculaire de 2030 à 7 atomes d'azote, 4 groupements (O)-CH₃ et 3 groupements (CO)-CH₃. Le poids moléculaire déterminé par la microméthode de Barger-Rast (76, 77) est voisin de 2000, ce qui est en assez bon accord avec la valeur calculée pour la formule brute

C₁₀₈H₁₈₅N₇O₂₈ (calculé : C 63,90 H 9,18 N 4,82 4(O)-CH₃ 2,95 3(CO)-CH₃ 2,15 P.M. :2030).

Soumis à une hydrolyse chlorhydrique, le mycoside est scindé en deux fractions, l'une hydrosoluble, l'autre lipidique éthérosoluble représentant 40 % du composé initial.

La partie hydrosoluble renferme des acides aminés et des sucres. Par chromatographie sur papier, on constate l'absence de glycérol, d'inositol et d'éthylène-glycol, constituants classiques de certains lipides bactériens (25, 85, 86).

A - Fraction aminée.

Nous avons recherché les acides aminés par chromatographie sur papier dans différents solvants : phénol-eau en milieu ammoniacal ; butanol-acide acétique-eau (65:10:25), phénol tamponné à différents pH selon Mac Farren (87). Trois composés révélables à la ninhydrine ont été décelés correspondant aux R_f de la thréonine, de l'alanine et de la phénylalanine (tableau 5).

Tableau 5

Valeurs de R_f des acides aminés du mycoside C et des trois acides aminés témoins : Thr, Ala et Phe.

solvants	R _f			
	1	2	3	4
thréonine	0,18	0,40	0,18	0,40
alanine	0,23	0,54	0,28	0,51
phénylalanine	-	0,77	0,82	0,85
hydrolysats	0,19	0,39	0,15	0,39
	0,25	0,53	0,25	0,50
	0,54	0,76	0,82	0,87

1 butanol-acide acétique-eau (65:10:25)

2 phénol-eau (80:20)

3 phénol tamponné à pH 6,2

4 phénol tamponné à pH 8

L'étude microbiologique a permis de préciser la configuration de ces acides aminés. L'alanine et la phénylalanine sont entièrement sous forme D. Les essais effectués par Ikawa et coll. (43) par chromatographie sur papier et avec la D-aminoacide oxydase ont démontré que le mycoside ne contenait pas de thréonine, mais de la D-*allo*-thréonine.

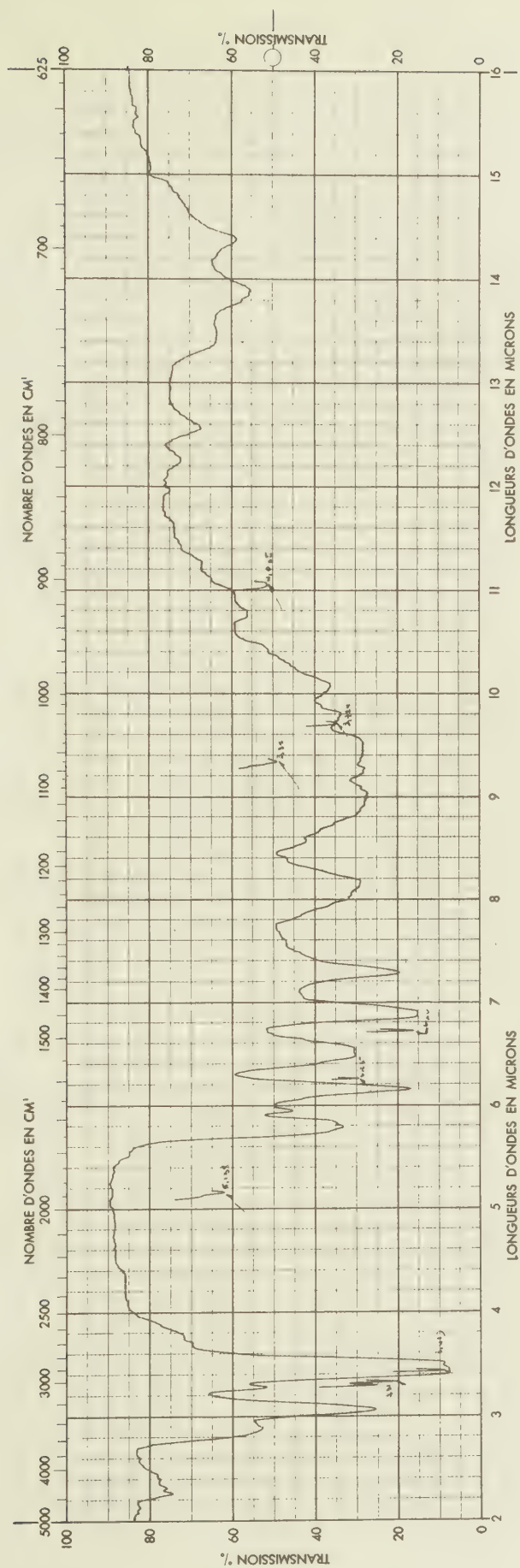


Figure 3 - Spectre d'absorption infra-rouge du mycoside C_m dans le KBr (Perkin-Elmer, Model 21).

Le tableau 6 donne les R_f observés dans le solvant : butanol-eau-acétone-ammoniaque (200:150:25:25).

Tableau 6

Valeurs de R_f de la thréonine et de l'*allo*-thréonine dans le solvant :

butanol-eau-acétone-ammoniaque (200:150:25:25)	
DL- <i>allo</i> -thréonine	1,00
thréonine (<i>M. Marianum</i>)	0,97
DL-thréonine	1,39

L'analyse quantitative sur Dowex 50 $\times$ 4 selon Moore et Stein (78) a permis de déterminer les proportions : D-*allo*-thréonine : 3, D-alanine : 3, D-phénylalanine : 1. La figure 4 représente la courbe obtenue.

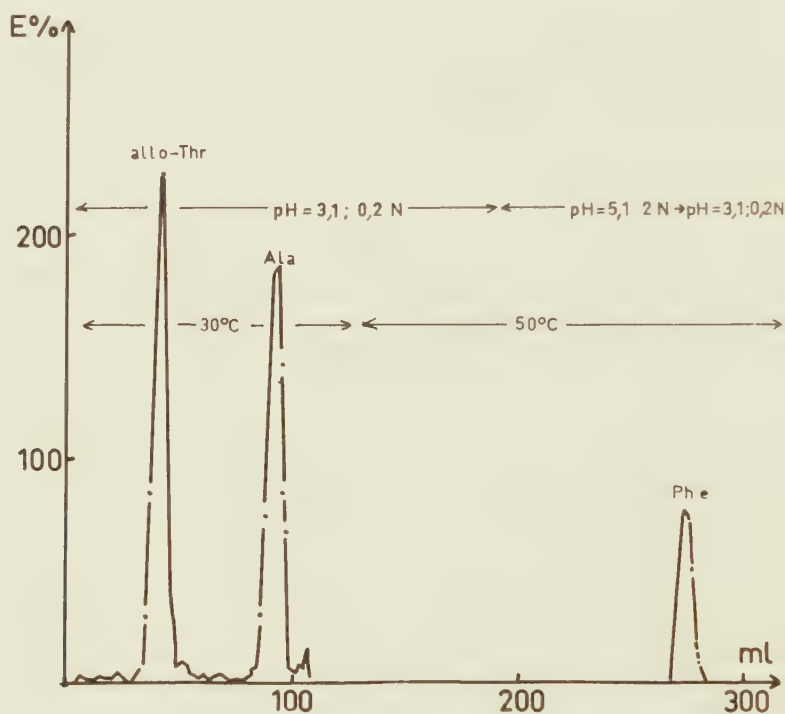


Figure 4 - Chromatographie sur résine Dowex 50 $\times$ 4 de l'hydrolysat total du mycoside C_m .

D'après la teneur en azote et le poids moléculaire on peut conclure que le mycoside C_m contient sept molécules d'acides aminés.

B - Fraction glucidique.

Les sucres sont recherchés dans l'extrait aqueux après hydrolyse chlorhydrique selon Mac Lennan et coll. (6).

Par chromatographie dans plusieurs solvants, on observe deux taches révélables par le phtalate d'aniline et par le système périodate-benzidine (70) de R_f très différents et nettement supérieurs à ceux des hexoses et des pentoses. Le tableau 7 donne la valeur de ces R_f .

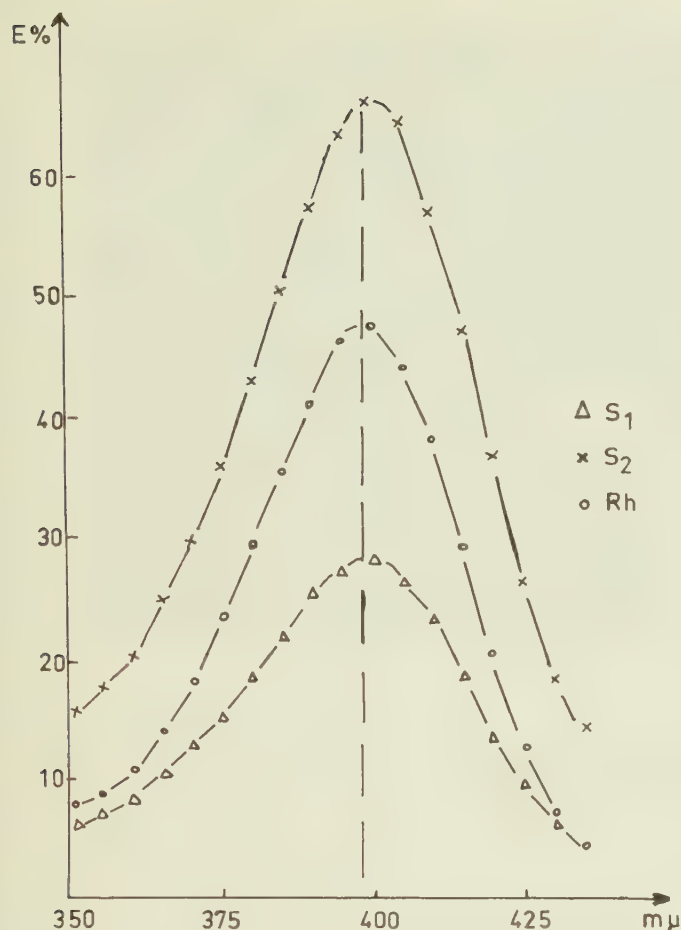


Figure 5 - Spectres d'absorption de S_1 , S_2 et du rhamnose témoin en milieu cystéine-sulfurique (spectrophotomètre Jouan).

Les sucres sont appelés respectivement S_1 et S_2 .

$$S_1 : R_{rh} = 1,31$$

$$S_2 : R_{rh} = 3,13$$

dans le solvant acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3)

$$(R_{rh} = R_f \text{ par rapport au rhamnose})$$

S_1 et S_2 ont pu être isolés par chromatographie préparative sur papier. Les extraits aqueux obtenus après hydrolyses chlorhydriques répétées sont passés sur colonne d'Amberlite MB₃ pour éliminer les acides aminés présents. La chromatographie est effectuée dans le solvant acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3). Les bandes de R_f correspondant aux sucres sont découpées, éluées par l'eau, et les éluats concentrés sous vide.

Nous avons montré que S_1 et S_2 étaient des 6-désoxyhexoses.

- Le réactif de Keller-Kiliani (88) donne avec S_1 et S_2 une coloration brun-rouge comme avec d'autres désoxyhexoses tels que le mycarose (89) et l'ascarylose (90).

- La réaction de Dische et Shettles (91) est positive. Les spectres d'absorption en milieu cystéine-acide sulfurique, identiques pour S_1 et S_2 et pour le rhamnose témoin (maximum à 396 mμ) ont montré que ces deux sucres étaient effectivement des 6-désoxyhexoses (figure 5).

Des chromatographies ont été effectuées en présence du 2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose et du 2, 4, 6-tri-O-méthylglucose. Après révélation par le phtalate d'aniline, on note les R_f indiqués dans le tableau 8 (le R_f du 2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose étant égal à 1,00).

Tableau 7
Valeurs de R_f de différents oses

Solvants	R_f	
	1	2
mannose	0,23	-
sorbose	0,22	-
arabinose	0,26	-
glucose	-	0,26
rhamnose	0,37	0,47
hydrolysat	{ 0,47	0,56
	{ 0,74	0,91

1 butanol-acide acétique-eau (65:10:25)

2 butanol-éthanol-eau (4:1:5)



Figure 6

- 1) S_1
- 2) S_2
- 3) 2, 4, 6-tri-O-méthylglucose
- 4) 2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose
- 5) A : glucose B : rhamnose



Figure 7

- 1) S_2
- 2) S_1
- 3) glucose
- 4) rhamnose
- 5) 2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose
- 6) 2, 4, 6-tri-O-méthylglucose

Tableau 8
Valeurs des R_g de S_1 , S_2 et de sucres témoins

Solvants	R_g	
	1	2
2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose	1,00	1,00
2, 4, 6-tri-O-méthylglucose	0,73	0,82
glucose	0,07	0,26
rhamnose	0,27	0,47
S_1	0,37	0,56
S_2	0,85	0,91

1 acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3) (figure 6)

2 butanol-éthanol-eau (5:1:4) (figure 7)

Nous constatons que le sucre S_2 a un R_g voisin d'un tri-O-méthylglucose ou d'un di-O-méthyl-6-désoxyhexose, et le sucre S_1 a un R_g voisin d'un mono-O-méthyl-6-désoxyhexose.

1 - Nature de S_1

L'examen des R_f par chromatographie sur papier en présence de 6-désoxytalose et d'autres 6-désoxyhexoses authentiques^(*) dans plusieurs solvants permet d'affirmer que S_1 est le 6-désoxytalose (tableau 9).

Tableau 9
Valeurs de R_f de S_1 et de divers 6-désoxyhexoses témoins

Solvants	R_f		
	1	2	2
xhamnose	0,56	0,62	0,37
fucose	0,45	0,60	0,30
6-désoxytalose	0,62	0,67	0,45
S_1	0,62	0,67	0,44

1 butanol-pyridine-eau (6:4:3) (figure 8)

2 acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3) (figure 9)

3 butanol-éthanol-eau (5:1:4) (figure 10)

S_1 reste inchangé après déméthylation par BCl_3 (92). L'analyse montre l'absence de groupements (O)- CH_3 . D'autre part, les points de fusion de S_1 F : 112-120° et du 6-désoxytalose authentique F : 116-118° sont sensiblement identiques. Le point de fusion du mélange ne subit pas de dépression. Le pouvoir rotatoire indique qu'il s'agit du dérivé L :

$$[\alpha]_D = -15^\circ \pm 5^\circ \text{ (H}_2\text{O, c = 1,5)}$$

$$[\alpha]_D \text{ théorique} = 18.9 \text{ (93)}$$

(*) Nous remercions les Professeurs E. L. Hirst (Edinburgh), T. Reichstein (Bâle) et G. F. Springer (Philadelphia) pour des échantillons de 6-désoxyhexoses et de leurs dérivés.

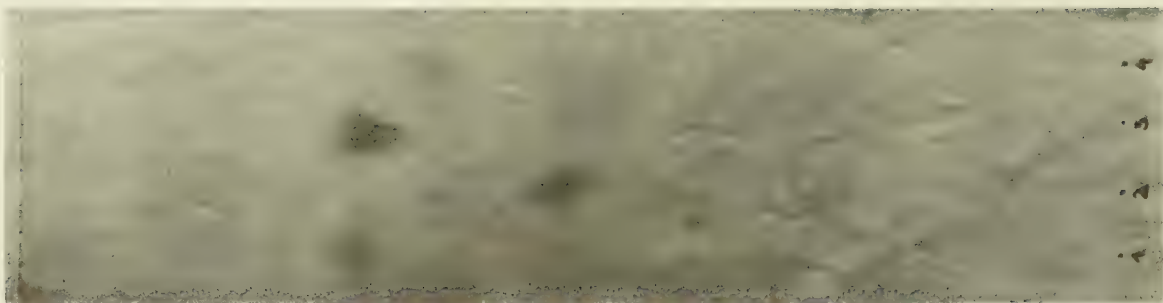


Figure 8

- | | |
|-------------------|-------------|
| 1) 6-désoxytalose | 3) S_1 |
| 2) fucose | 4) rhamnose |



Figure 9

- | | |
|-------------|-------------------|
| 1) rhamnose | 3) 6-désoxytalose |
| 2) fucose | 4) S_1 |



Figure 10

- | | |
|-------------------|-------------|
| 1) fucose | 3) S_1 |
| 2) 6-désoxytalose | 4) rhamnose |

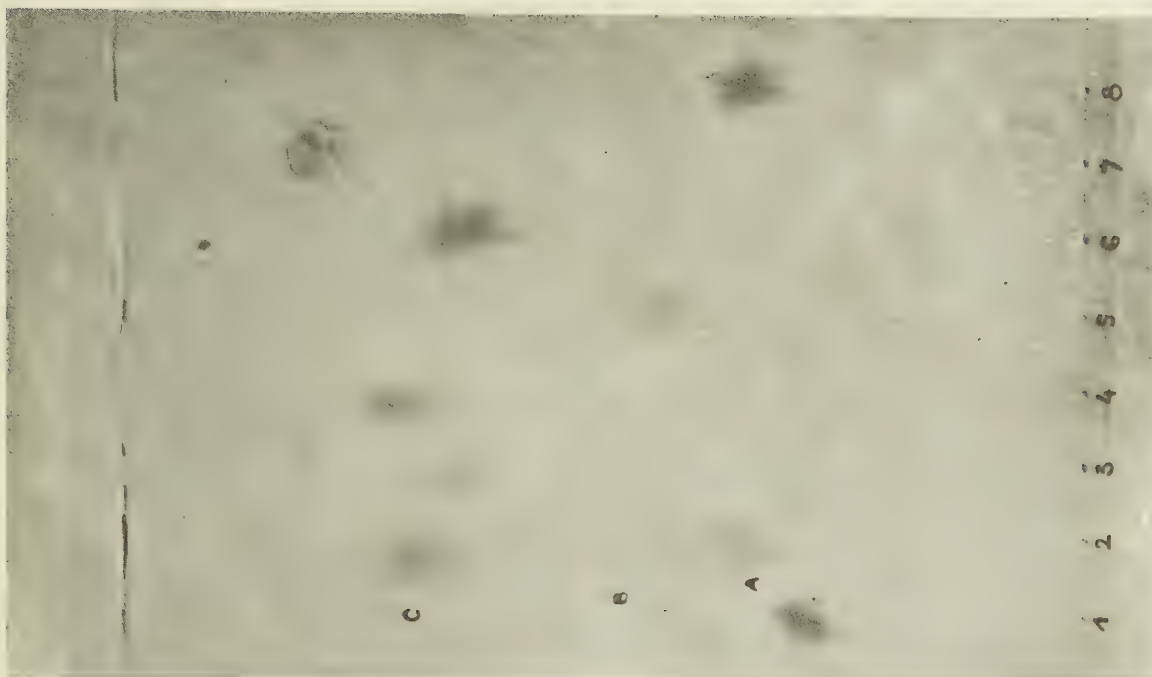


Figure 11

- | | |
|--------------------------------|-------------------------------------|
| 1) fucose | 5) S_1 |
| 2) S_2 déméthylé | 6) 2, 4, 6-tri-O-méthylglucose |
| 3) 2, 4, 6-tri-O-méthylglucose | 7) 2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose |
| 4) S_2 | 8) rhamnose |

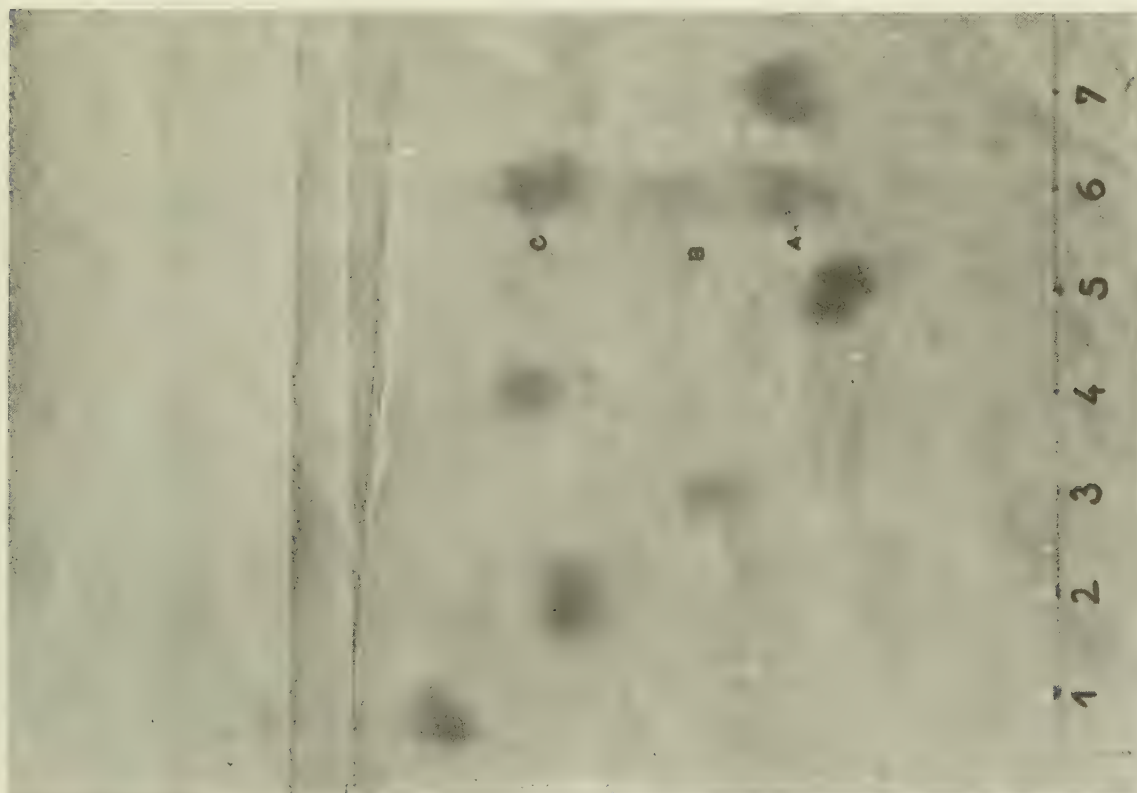


Figure 12

- | | |
|-------------------------------------|--------------------|
| 1) 2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose | 5) fucose |
| 2) 2, 4, 6-tri-O-méthylglucose | 6) S_2 déméthylé |
| 3) S_1 | 7) rhamnose |
| 4) S_2 | |



Figure 13

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| 1) fucose | 7) 3, 4-di-O-méthylrhamnose |
| 2) 3-O-méthylfucose | 8) S_2 |
| 3) S_1 | 9) 4-O-méthylrhamnose |
| 4) 2, 4, 6-tri-O-méthylglucose | 10) 3-O-méthylrhamnose |
| 5) 2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose | 11) S_2 déméthylé |
| 6) 2, 4-di-O-méthylrhamnose | 12) rhamnose |



Figure 14

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|
| 1) fucose | 6) 2, 4-di-O-méthylrhamnose |
| 2) 3-O-méthylfucose | 7) 3, 4-di-O-méthylrhamnose |
| 3) S_1 | 8) S_2 |
| 4) 2, 4, 6-tri-O-méthylglucose | 9) 4-O-méthylrhamnose |
| 5) 2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose | |

2 - Nature de S₂.

Le comportement chromatographique de S₂ est celui d'un di-O-méthyl-6-désoxyhexose.

Après déméthylation de ce sucre par BCl₃ (92) le produit est étudié par chromatographie dans deux solvants différents (tableau 10 : solvants 1, 2 et 3) (figure 11, 12 et 13).

Tableau 10

Valeurs de R_f de S₁, S₂ et de dérivés méthylés du glucose et du rhamnose

Solvants	R _f			
	1	2	3	4
rhamnose	0,33	0,42	0,41	0,53
2, 4-di-O-méthylrhamnose	-	-	0,81	0,77
3, 4-di-O-méthylrhamnose	-	-	0,77	0,78
2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose	0,77	0,90	0,87	0,81
2, 4, 6-tri-O-méthylglucose	0,65	0,71	0,72	0,74
S ₁	0,44	0,52	-	-
S ₂	0,70	0,79	0,76	0,76
S ₂ déméthylé	0,36	0,40	0,40	-
	0,48	0,54	0,52	-
	0,71	0,80	0,75	-

1 butanol-éthanol-eau (4:1:5) (figure 11)

2 alcool tert-amylique-alcool propylique-eau (4:1:5) (figure 12)

3 acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3) (figure 13)

4 butanol-pyridine-eau (6:4:3) (figure 14)

On observe trois taches révélables par le phtalate d'aniline. L'une correspond à l'ose initial, l'autre à un 6-désoxyhexose monométhylé, la troisième à un 6-désoxyhexose. Dans plusieurs solvants (solvants 1, 2 et 3, tableau 10), ce dernier se comporte comme le rhamnose. S₂ est donc un di-O-méthylrhamnose. D'autre part, il est révélé par le système périodate-benzidine (70), or parmi les dérivés diméthylés, seul le 3, 4-di-O-méthylrhamnose qui possède deux hydroxyles adjacents réagit avec le périodate. Par chromatographie dans plusieurs solvants, S₂ a le même R_f que le 3, 4-di-O-méthylrhamnose (tableau 10 : solvants 3 et 4) (figure 13 et 14).

$$[\alpha]_D^{20} = +20 \pm 2^\circ \text{ (H}_2\text{O, } c = 1,3)$$

$$[\alpha]_D^{20} \text{ théorique} = +18^\circ 5' \text{ (94)}$$

3 - Dosage des sucres.

Nous avons utilisé la méthode colorimétrique de Dische et Shettles (91). Le dosage, après hydrolyse chlorhydrique selon Mac Lennan (6), est effectué en utilisant le rhamnose comme étalon. Pour chaque concentration de rhamnose et pour l'échantillon inconnu, on mesure par planimétrie l'aire comprise entre l'axe des abscisses et la courbe d'absorption de 350 à 435 mμ.

Le dosage de chaque sucre après chromatographie sur papier, élution et spectrophotométrie donne : S₁, 7 %, S₂, 13, 4 %. Il y a donc une molécule de 6-désoxy-L-talose et deux molécules de 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose.

C - Fraction lipidique.

L'hydrolyse du mycoside C_m par HCl N d'après Mac Lennan (6), fournit une partie lipidique contenant encore de l'azote. L'hydrolyse énergétique de cette substance par HCl concentré en milieu éthanolique selon Crombie (95) scinde la liaison amide et libère la D-phénylalanine avec une fraction acide éthersoluble qui représente 42 % du mycoside initial.

L'obtention d'une partie lipidique renfermant la D-phénylalanine indique que cet acide aminé est lié à un groupement carboxylique par une liaison amide résistant à une hydrolyse ménagée et rompue dans des conditions plus sévères. Après estérification par le diazométhane la fraction acide est chromatographiée sur colonne d'acide silicique. L'analyse de l'ester élué par benzène-éther (9:1) est en accord avec la formule d'un hydroxyester diéthylénique C₅₁H₉₈O₃. Le spectre infrarouge indique la présence d'une fonction alcool, bande à 2,9 μ (figure 15).

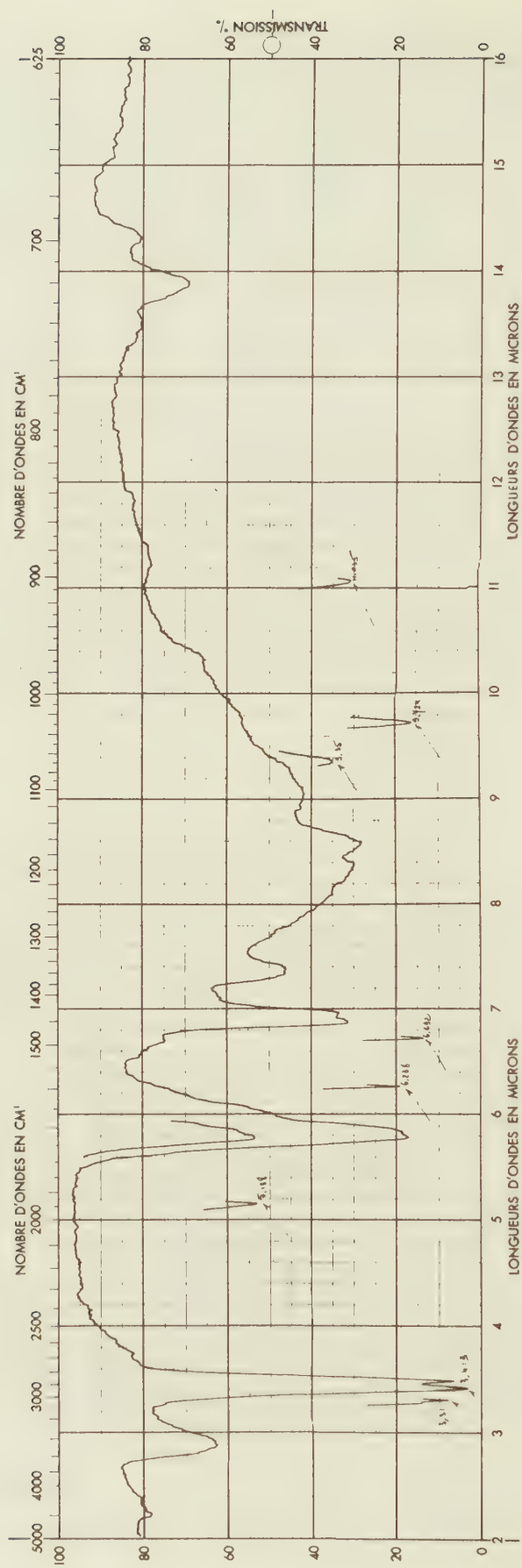


Figure 15 - Spectre d'absorption infra-rouge de l'ester méthylique $C_{51}H_{98}O_3$.

Par micro-hydrogénation catalytique sur PtO_2 , deux molécules d'hydrogène sont absorbées. La partie lipidique est donc vraisemblablement un hydroxyacide insaturé $\text{C}_{50}\text{H}_{96}\text{O}_3$.

Notons qu'un hydroxyacide $\text{C}_{50}\text{H}_{96}\text{O}_3 + 3\text{CH}_2$, l'acide nocardique, a été isolé des lipides de *Nocardia asteroides* (96).

D - Conclusions.

Tous les constituants du mycoside C_m sont identifiés : 7 molécules d'acides aminés : D-Phe₁, D-*allo*-Thr₃, D-Ala₃, 3 molécules de sucres : 6-désoxy-L-talose, (3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose)₂, 3 groupements acétyles, un hydroxyacide $\text{C}_{50}\text{H}_{96}\text{O}_3 + 3\text{CH}_2$ lié à la phénylalanine par une liaison amide.

Cette première partie de notre étude a mis en évidence trois points intéressants :

- L'identification de D-*allo*-thréonine trouvée pour la première fois dans une substance naturelle.

- La configuration D des acides aminés.

Les acides aminés de configuration D sont assez fréquents chez les microorganismes. Ils entrent dans la constitution de nombreux antibiotiques polypeptidiques, par exemple, *D-leucine* dans l'étamycine et la gramicidine (97, 98), *D-phénylalanine* dans la bacitracine (99), *D-valine* et *D-isoleucine* dans la valinomycine (100). On les a également signalés dans les peptidolipides bactériens, ainsi la D-alanine et la D-*allo*-isoleucine sont des constituants de la peptidolipine NA isolée de *Nocardia asteroides* (101). Cependant ils sont généralement accompagnés d'acides aminés de configuration L. Il est intéressant de constater que les acides aminés du mycoside C_m sont tous de configuration D.

- La présence de 6-désoxyhexoses appartenant à la série L, méthylés ou non.

Des oses de ce type, 6-désoxy-L-talose (102) 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose (103), 6-désoxy-L-allose (104), 3-O-méthyl-L-rhamnose (105) ont été trouvés dans le règne végétal comme constituants des glycosides cardiotoniques, mais c'est en 1960, que la présence de 6-désoxyhexoses, O-méthylés ou non, est signalée pour la première fois dans les lipides de plusieurs mycobactéries (6). Mac Lennan et coll. (6, 10) ont identifié le 2-O-méthylfucose, le 2-O-méthylrhamnose et le 2,4-di-O-méthylrhamnose, dans le mycoside A caractéristique des souches photochromogènes, et le 2-O-méthylrhamnose dans le mycoside B, spécifique de *M. bovis*. Ce dernier ose a la configuration D (52, 53). Le mycoside C, caractéristique de *M. avium*, contient selon Mac Lennan, les sucres suivants : 6-désoxytalose, 3-O-méthyl-6-désoxytalose ; 2, 3- et 3, 4-di-O-méthylrhamnose et 3-O-méthylrhamnose (106). Dans le chapitre suivant, nous décrirons les mycosides C_2 , mélanges de peptidoglycolipides, isolés de deux souches de *M. avium*, dans lesquels nous avons identifié le 6-désoxy-L-talose, le 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose et le 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose. Ainsi les sucres des mycosides C appartiennent à la série L. Signalons que le 6-désoxy-L-talose a été isolé par Mac Lennan de la paroi cellulaire d'une souche d'*Actinomyces bovis* (107) tandis que le D-rhamnose et le 6-désoxy-D-talose ont été trouvés par Markowitz dans un polysaccharide bactérien (108).

III - STRUCTURE DU MYCOSIDE C.

Nous avons précisé la structure en déterminant l'enchaînement peptidique et la position des molécules d'oses.

A - Etude de la partie osidique.

Le mycoside n'est pas réducteur. Un essai d'oxydation par hypoiodite (109) a montré que toutes les fonctions pseudo-aldéhydiques étaient combinées.

1 - Position des sucres.

Le mycoside est traité par NaBH_4 en milieu alcalin. Deux fractions sont recueillies.

- La fraction soluble dans le chloroforme est hydrolysée par HCl N selon Mac Lennan (6). On extrait la partie lipidique à l'éther et dans la partie hydrosoluble, on effectue le dosage des sucres selon la méthode de Dische et Shettles (91). Les résultats indiquent que S_1 a été en majeure partie libéré.

- La fraction hydrosoluble est analysée par chromatographie sur papier. Dans le solvant acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3), on observe une tache unique, correspondant vraisemblablement au 6-désoxy-L-talitol non révélable par le phtalate d'aniline, révélée par le système périodate-benzidine et dont le R_f est voisin de celui du 6-désoxy-L-talose.

D'autre part, lorsqu'on traite le mycoside par l'hydroxylamine (qui coupe spécifiquement les liaisons esters) (110), on obtient une fraction hydrosoluble qui ne renferme qu'un seul sucre, le 6-désoxy-L-talose, décelé par chromatographie sur papier.

Ces résultats semblent prouver que le 6-désoxy-L-talose est lié au carboxyle de l'acide aminé C-terminal par une liaison ester. Celle-ci est coupée par l'hydroxylamine et par NaBH_4 en milieu alcalin. Dans ce dernier cas, on obtient l'alcool correspondant au 6-désoxy-L-talose, ce qui est en faveur d'une liaison avec le groupement pseudo-aldéhydique du sucre. En effet NaBH_4 est généralement sans action sur les esters mais agit par contre lorsque le groupement réducteur d'un ose est engagé dans la liaison ester. Une telle réaction a déjà été observée par Polonsky et coll. dans le cas de l'asiaticoside (111). Une confirmation a d'ailleurs été apportée par l'étude des produits de la méthylation du mycoside C_m dont nous donnerons les résultats ci-dessous.

Nous constatons d'autre part que le 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose n'est libéré ni par le traitement avec NaBH_4 , ni par action de l'hydroxylamine. Il est donc lié à un hydroxyle par une liaison osidique. Les résultats de la méthylation ont montré que les deux molécules de S_2 étaient liées à deux molécules de D-*allo*-thréonine.

2 - Position des groupements acétyles.

Nous avons vu que le mycoside C_m renferme des groupements acétyles. Le spectre infrarouge (figure 3) présente la bande caractéristique à $8,15 \mu$ et le dosage indique $3(\text{CO})-\text{CH}_3$ par mole de mycoside.

a) Méthylation du mycoside C_m .

La méthylation du mycoside est effectuée par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent dans le diméthylformamide selon la technique de Kuhn et coll. (112). Le produit méthylé est chromatographié sur trisilicate de magnésium-célite. La fraction ne présentant pas de bande -OH à l'infrarouge correspond au mycoside complètement méthylé. L'hydrolyse de cette fraction par HCl N selon Mac Lennan (6), fournit une partie lipidique et une partie hydrosoluble. Cette dernière renferme le mélange des sucres méthylés, elle est analysée par chromatographie sur papier dans le solvant acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3). La révélation par le phtalate d'aniline indique la présence de trois taches :

- la première correspond au 2, 3, 4-tri-O-méthyl-L-rhamnose : S_2 méthylé.
- la deuxième correspond au 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose : S_2 inchangé.
- la troisième correspond à un *mono-O-méthyl-6-désoxytalose*.

Le tableau 11 indique les R_f obtenus, en présence de dérivés authentiques

Tableau 11

Valeurs de R_f de 6-désoxyhexoses et de leurs dérivés-O-méthylés

Solvant : acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3)			
rhamnose	0,41		
6-désoxytalose		0,48	
3-O-méthyl-6-désoxytalose		0,62	
2, 3, 4-tri-O-méthylrhamnose			0,88
S_1	0,48		
S_2		0,75	
<u>Hydrolysats du mycoside C_m</u>			
a) méthylé		0,62	0,75 0,88
b) méthylé et désacétylé			0,88

Dans le mycoside initial :

- S_1 , donnant un dérivé monométhylé, possède un hydroxyde libre.
- Une molécule de S_2 , non modifiée après méthylation et hydrolyse, ne possède pas d'hydroxyde libre.

D'autre part, la fraction lipidique obtenue après méthylation et hydrolyse ne donne plus de bande -OH à l'infra-rouge. La fonction hydroxyle a été méthylée, elle était donc libre dans le mycoside initial et les deux molécules de S_2 sont par conséquent fixées sur la partie peptidique.

b) Méthylation du mycoside C_m traité préalablement par $NaBH_4$.

La fraction extraite par le chloroforme après traitement par $NaBH_4$ ne contient plus de 6-désoxy-L-talose. Elle est méthylée selon la technique de Kuhn et coll. (112), puis chromatographiée sur trisilicate de magnésium-célite. La fraction ne renfermant plus de groupement -OH est hydrolysée par HCl N à 100° pendant 16 heures. La chromatographie sur papier de l'hydrolysate dans le solvant acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3) montre seulement deux taches très intenses, après révélation par le phthalate d'aniline : la première correspond au 2, 3, 4-tri-O-méthyl-L-rhamnose : S_2 méthylé, la deuxième correspond au 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose : S_2 inchangé. Les résultats sont indiqués dans le tableau 12.

Tableau 12

Valeurs de R_f de 6-désoxyhexoses et de leurs dérivés O-méthylés

Solvant : acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3)

rhamnose	0, 37	
2, 3, 4-tri-O-méthylrhamnose		0, 89
3-O-méthyl-6-désoxytalose	0, 67	
S_1	0, 48	
S_2		0, 78
hydrolysate du mycoside C_m		
méthylé, après action de $NaBH_4$		0, 78 0, 89

Le dérivé monométhylé du 6-désoxy-L-talose (S_1) trouvé après méthylation du mycoside initial, est absent dans cette chromatographie. En effet, nous avons vu que S_1 était libéré du mycoside par action de $NaBH_4$.

c) Méthylation du mycoside C_m désacétylé.

L'obtention d'oses partiellement méthylés après méthylation complète du mycoside C_m laisse supposer que certains hydroxyles de S_1 et de S_2 sont acétylés. La désacétylation est effectuée par le méthylate de sodium à froid (113). Le produit désacétylé est méthylé comme précédemment. Après chromatographie sur trisilicate de magnésium-célite, la fraction ne possédant plus de bande -OH à l'infra-rouge est hydrolysée. La chromatographie sur papier dans le solvant acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3) donne une tache unique correspondant à un tri-O-méthyl-6-désoxyhexose : tableau 12.

Ce résultat montre que le méthylate de sodium a libéré trois hydroxyles des oses primitivement acétylés, l'un appartenant à une molécule de S_2 , les deux autres appartenant à S_1 et la méthylation a donné un mélange de 2, 3, 4-tri-O-méthyl-L-rhamnose et de 2, 3, 4-tri-O-méthyl-6-désoxy-L-talose.

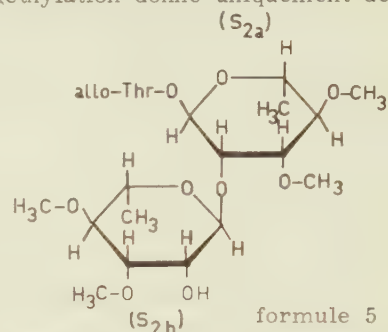
d) Discussion des résultats des méthylation.

Le résultat obtenu après méthylation du mycoside désacétylé permet de confirmer que le 6-désoxy-L-talose est lié au peptide par son groupement pseudo-aldéhydique. Si la liaison ester avait lieu avec un -OH alcoolique du sucre, la méthylation du mycoside désacétylé donnerait un di-O-méthyl-6-désoxytalose et non un dérivé triméthylé.

- La méthylation du mycoside initial donne une mole de S_2 triméthylé, une mole de S_1 inchangé et une mole de S_1 monométhylé, alors qu'après désacétylation, la méthylation donne uniquement des dérivés triméthylés.

Donc, le mycoside initial renferme :

- une mole de 6-désoxy-L-talose diacétylée
- une mole de 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose monoacétylée,
- une mole de 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose non acétylée.



L'emplacement des groupements acétyles est ainsi précisé et l'éventualité d'un diholoside est exclue. En effet, l'obtention d'une molécule de S_2 non modifiée après méthylation du mycoside C_m initial a montré que l'hydroxyde en 2 de cette molécule de 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose n'est pas libre. Ce résultat pourrait laisser supposer la présence éventuelle du diholoside représenté par la formule 5.

S'il en était ainsi, après méthylation du mycoside désacétylé, S_{2a} devrait être inchangé ; or, on obtient dans ce cas uniquement des dérivés triméthylés. L'hydroxyle en 2 de la molécule de S_{2a} est donc lié à un acétyle dans le mycoside initial et la présence du diholoside est exclue.

B - Etude de la partie peptidique.

L'enchainement peptidique a été déterminé par l'étude des produits obtenus après hydrolyses partielles.

1 - Hydrolyse partielle n° 1.

Le mycoside est hydrolysé par HCl 12 N à 37° pendant 7 jours.

a) Partie hydrosoluble.

Après extraction par l'éther de la partie lipidique, dessalification de la phase aqueuse, la partie hydrosoluble est analysée par chromatographie sur papier. On observe des traces d'acides aminés libres et une seule tache importante de $R_f = 0,30$ dans le solvant butanol-acide acétique eau-(65:10:25) qui apparaît en jaune à la ninhydrine et vire au rouge-violet. Cette tache correspond à un peptide P qui a été isolé par chromatographie préparative sur papier.

Le peptide P est hydrolysé totalement par HCL 6N à 110° pendant 24 heures. La chromatographie sur papier de l'hydrolysate indique deux taches *allo*-Thr et Ala. Le dosage de ces acides aminés est effectué sur Amberlite GG 120 selon Spackman et coll. (79). Il donne les rapports molaires : *allo*-Thr : 1, Ala : 1. La figure 16 représente la courbe obtenue.

La coloration jaune donnée par la ninhydrine indique la position N-terminale de l'*allo*-thréonine (114). Ce point a été confirmé par la dinitrophénylation du peptide (115). Le DNP amino-acide est identifié à la DNP *allo*-thréonine par chromatographie dans plusieurs solvants (tableau 13).

Tableau 13

Valeurs de R_f de DNP amino-acides

Solvants	R_f			
	1	2	3	4
DNP thréonine témoin	0,20	0,01	0,20	0,55
DNP A. A. du peptide P	0,20	0,01	0,00	0,57
DNP alanine témoin	0,30	0,35	0,06	0,62

1 alcool benzylique-éthanol-tampon phtalate, pH 6 (35:3, 5)

2 xylène-acide acétique 1 %-tampon phtalate, pH 6(10:5:4) (117)

3 benzène-acide acétique 1 % (1:1) (118)

4 butanol-éthanol-eau (4:1:5)

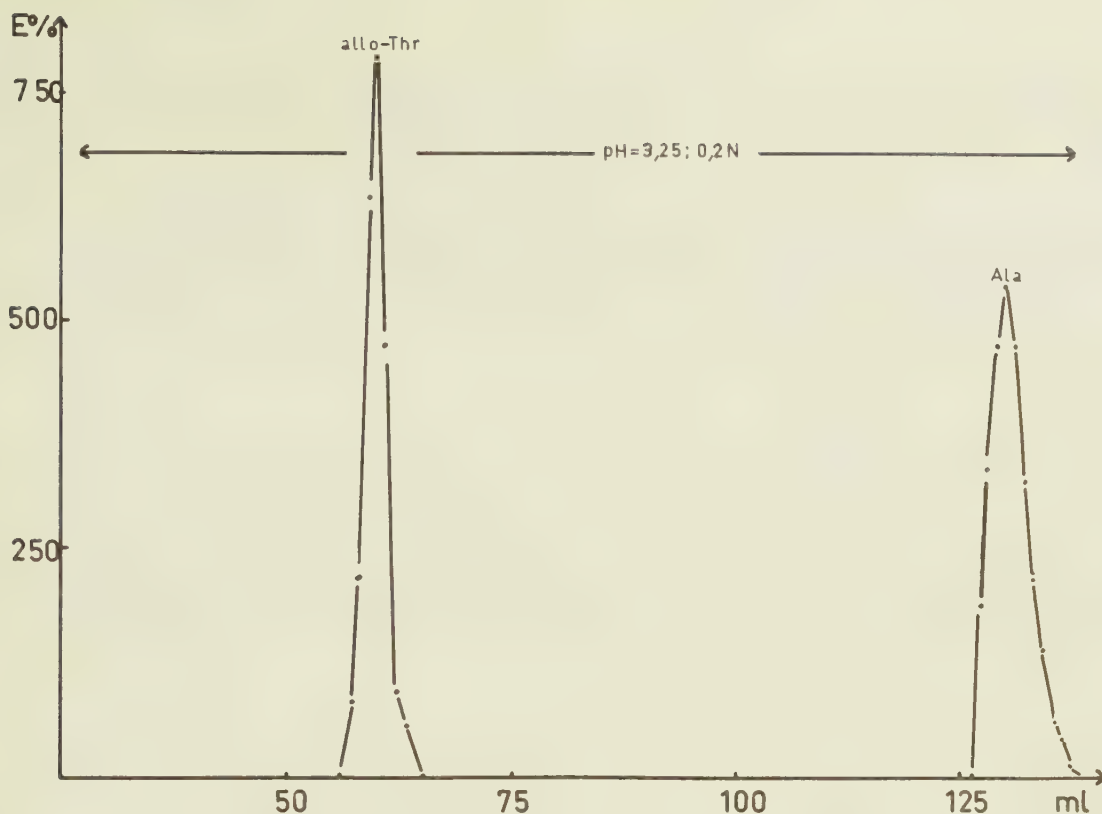


Figure 16 - Chromatographie sur colonne d'Amberlite GG 120 de l'hydrolysate total du peptide P obtenu après hydrolyse partielle du mycoside C_m.

Après la réaction de Sanger, l'analyse des acides aminés non dinitrophénylés, par chromatographie sur papier et sur colonne (figure 17), montre qu'il ne reste que D-Ala.

P est donc le dipeptide D-*allo*-Thr-D-Ala

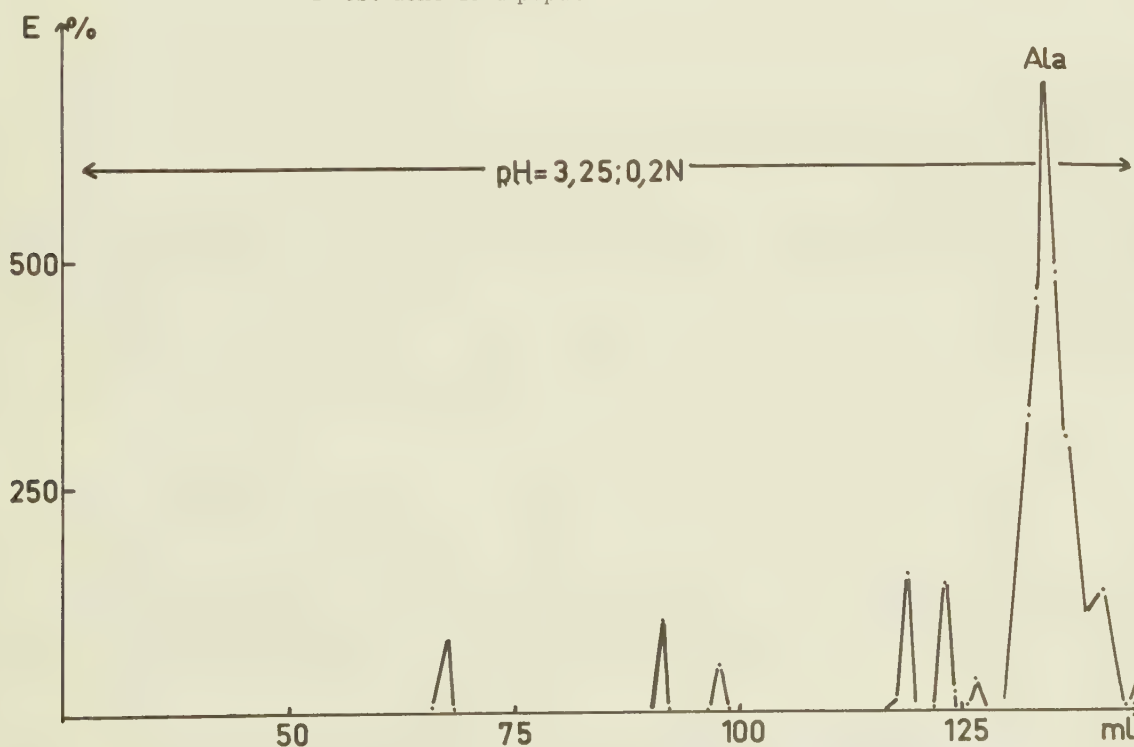


Figure 17 - Chromatographie sur colonne des acides aminés non dinitrophénylés du peptide P obtenu après hydrolyse partielle du mycoside C_m.

b) La partie lipidique provenant de l'hydrolyse partielle est soumise à une hydrolyse plus poussée selon Crombie (95), qui coupe les liaisons amides. L'hydrolysât analysé par chromatographie sur papier, donne uniquement la phénylalanine. On confirme ainsi l'existence d'une liaison amide entre un carboxyle de la partie lipidique et le groupement NH₂ de la phénylalanine.

Nous constatons que cette hydrolyse partielle ne libère pas d'acides aminés libres mais seulement le dipeptide : D-*allo*-Thr-D-Ala. Par conséquent, l'heptapeptide initial du mycoside C₁ contient trois unités dipeptidiques : D-*allo*-Thr-D-Ala. Il a la structure suivante :



Avec un autre arrangement, l'hydrolyse partielle aurait donné soit des acides aminés libres, soit d'autres peptides.

2 - Hydrolyse partielle n° 2.

Le mycoside est soumis à une hydrolyse partielle plus douce par HCl 3 N à 37° pendant 16 heures. Après les opérations habituelles, la fraction hydrosoluble est analysée par chromatographie sur papier. On note la présence de plusieurs peptides et de 6-désoxy-L-talose. Il n'y a pas d'acides aminés libres et peu de 3,4-di-O-méthyl-L-rhamnose. Un dosage des oses par spectrophotométrie sur les éluats des taches chromatographiques confirme que la totalité du 6-désoxy-L-talose a été libérée alors que le di-O-méthyl-L-rhamnose n'existe qu'à l'état de traces. Le tableau 14 schématise les résultats de la chromatographie avec le solvant butanol-acide acétique-eau (65:10:25).

Tableau 14

Valeurs de R_F de peptides obtenus par hydrolyse partielle du mycoside

Solvant : butanol-acide acétique-eau (65:10:25)

<u>Peptides</u>	<u>R_F</u>	<u>Coloration ninhydrine</u>
P _a	0,37	jaune → brun → violet
P _b	0,56	jaune → brun → violet
P _c	0,61	rose-violet
P _d	0,74	rose-violet

Les différents peptides obtenus par chromatographie préparative sur papier ont été soumis d'une part à une hydrolyse totale, d'autre part à une hydrolyse ménagée.

- L'hydrolyse totale est effectuée par HCl 6 N à 110° pendant 24 heures, les hydrolysats sont chromatographiés sur papier. L'évaluation quantitative des proportions respectives de chaque amino-acide est réalisée par comparaison avec des gammes témoins contenant les différents acides aminés à des concentrations connues. On obtient les résultats indiqués dans le tableau 15.

Tableau 15

Composition en acides aminés des peptides obtenus par hydrolyse partielle du mycoside C₁.

<u>Peptides</u>	<u>Acides aminés présents</u>	<u>Proportions molaires</u>
P _a	D- <i>allo</i> -Thr, D-Ala	1:1
P _b	D- <i>allo</i> -Thr, D-Ala	1:1
P _c	D-Phe, D- <i>allo</i> -Thr, D-Ala	1:1:1
P _d	D-Phe, D- <i>allo</i> -Thr, D-Ala	non déterminées

- L'hydrolyse ménagée est effectuée par HCl N à 100° pendant 16 heures, les hydrolysats sont étudiés par chromatographie sur papier.

- P_a reste inchangé, il est donc relativement résistant à l'hydrolyse. De plus, il a la même composition et le même R_f que le peptide P isolé précédemment et il donne la même coloration à la ninhydrine. Par conséquent, P est le dipeptide déjà obtenu :



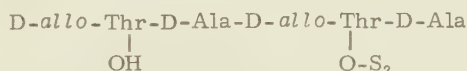
- P_b donne après une nouvelle hydrolyse ménagée et chromatographie sur papier trois taches dont deux révélables à la ninhydrine et la troisième au phtalate d'aniline. Dans le solvant butanol-acide acétique-eau (65:10:25), on obtient les résultats donnés dans le tableau 16.

Tableau 16
Valeurs de R_f des produits d'hydrolyse du peptide P_b

Solvant : butanol-acide acétique-eau (65:10:25)

<u>Produit</u>	<u>R_f</u>	<u>ninhydrine</u>	<u>phtalate</u>
P_b hydrolysé par HCl N	1 0,31	jaune	-
	2 0,58	rose	-
	3 0,75	-	+
P_b initial	0,56	jaune	-
P_a	0,31	jaune	-
S_2	0,75	-	+

On note la libération d'un dipeptide identique à P_a : $D\text{-}allo\text{-}Thr\text{-}D\text{-}Ala$ et de 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose. Ce résultat indique que P_b contient une molécule de sucre S_2 liée à l'hydroxyde de la $D\text{-}allo$ -thréonine. On peut attribuer à P_b la structure suivante :



Lors de la première hydrolyse partielle, seule la liaison avec la molécule d' $allo$ -thréonine ayant un hydroxyle libre a été coupée. Une hydrolyse plus poussée du glycopeptide P_b a scindé la liaison osidique et le tétrapeptide obtenu, sensibilisé par l'apparition du groupement -OH de l' $allo$ -thréonine, s'est scindé en donnant deux molécules de dipeptide $D\text{-}allo\text{-}Thr\text{-}D\text{-}Ala$.

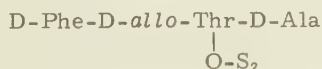
D'autre part, la structure de P_b a été vérifiée par une autre voie. Après hydrolyse selon Mac Lennan, (6), nous avons dosé le 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose libéré. Le dosage est effectué par spectrophotométrie selon Dische et Shettles (91) après chromatographie sur papier et élution des taches. Il donne S_2 : 22 % (calculé pour le tétrapeptide, S_2 : 35 %). La faible valeur obtenue s'explique par l'imprécision du dosage en raison des petites quantités utilisées. Toutefois, un dosage identique effectué sur le tripeptide P_c utilisé comme témoin et dont la structure est connue sans ambiguïté donne un résultat analogue.

S_2 trouvé : 25 %

calculé : 37 %

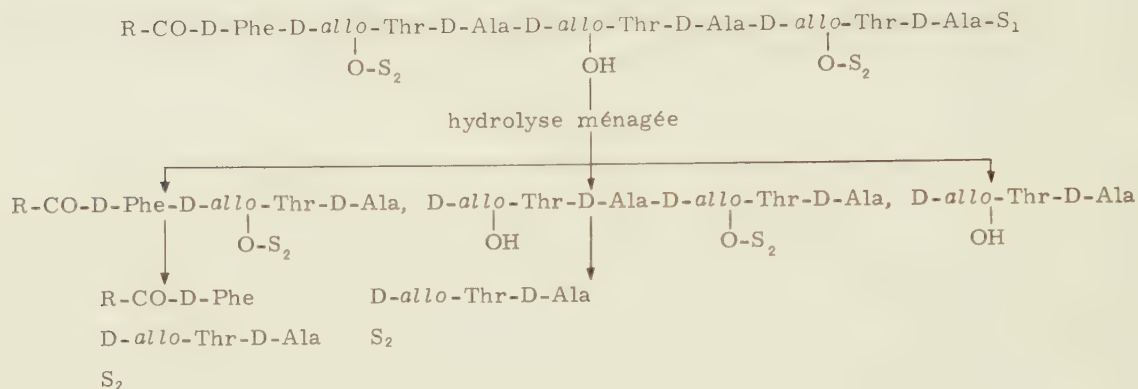
Dans les deux cas, les rapports sucres/acides aminés sont identiques.

- P_c renferme en proportions équimoléculaires $D\text{-}Phe$, $D\text{-}allo\text{-}Thr$ et $D\text{-}Ala$. C'est donc un tripeptide puisque le mycoside C_m ne contient qu'une molécule de phénylalanine. Soumis à une hydrolyse plus poussée P_c donne les trois acides aminés et le sucre S_2 . Il s'agit par conséquent d'un tripeptide renfermant une molécule de 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose liée à l'hydroxyde de l' $allo$ -thréonine, soit :



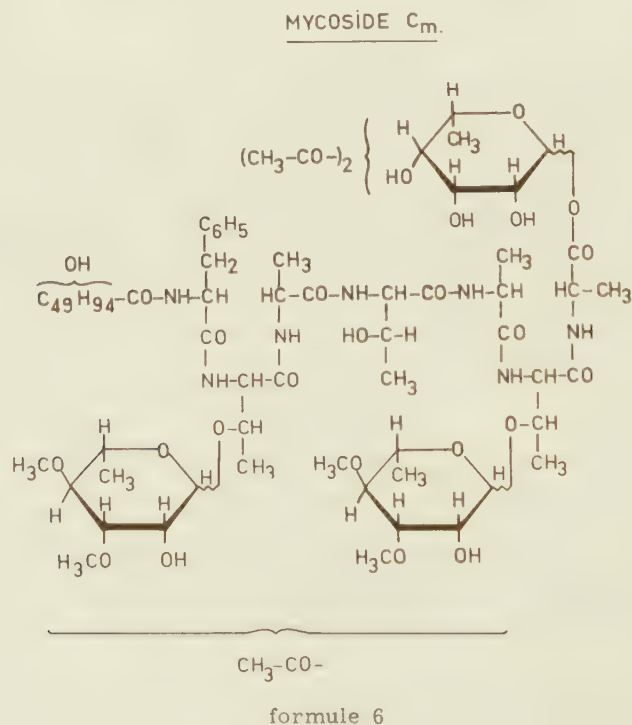
Le tableau 17 résume les résultats obtenus après hydrolyses partielles du mycoside C_m .

Tableau 17
Hydrolyse du mycoside C_m



IV - FORMULE DU MYCOSIDE C_m .

L'ensemble des résultats obtenus permet d'écrire l'enchaînement peptidique et de préciser l'emplacement des molécules d'oses. Seule une molécule de D-allo-thréonine a un hydroxyle libre, ce qui constitue dans la chaîne peptidique un point plus sensible à l'action de HCl et explique l'obtention des glycopeptides P_b et P_c lors de l'hydrolyse partielle. Par ailleurs, nous savons que la D-phénylalanine est attachée à la partie lipidique et que le 6-désoxy-L-talose est lié par sa fonction pseudo-aldéhydique au carboxyle de la D-alanine par une fonction ester. On peut donc représenter le mycoside C_m par la formule 6.



CHAPITRE IV

LE MYCOSIDE C₂

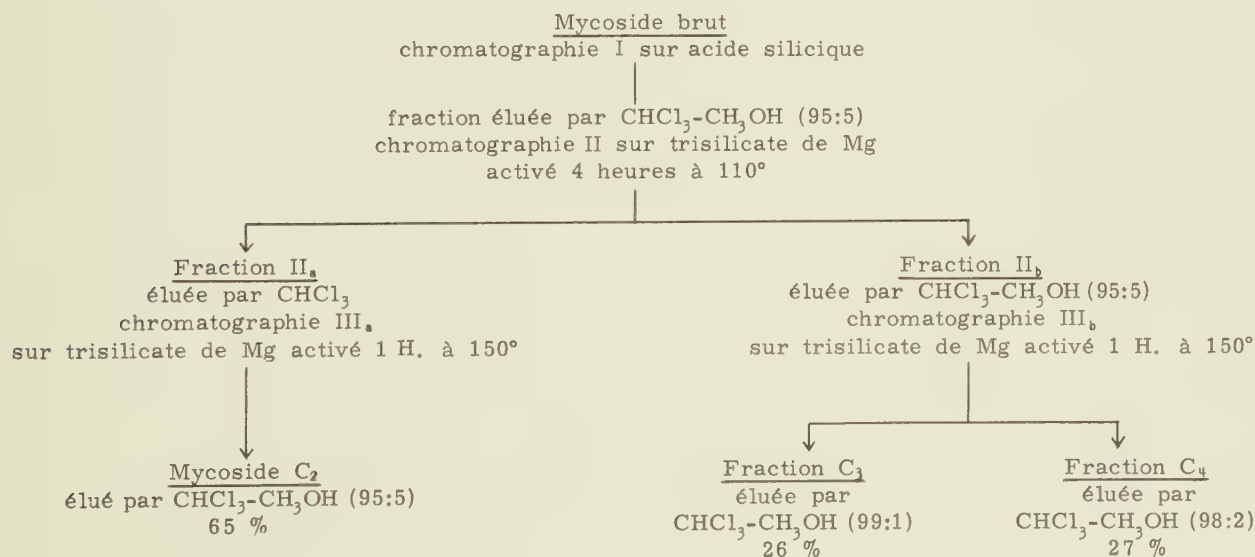
I - ISOLEMENT ET PURIFICATION DU MYCOSIDE C₂.

L'extraction de *M. avium*, cultivé pendant quatre semaines sur milieu de Sauton, est effectuée par le mélange alcool-éther (1:1). L'extrait éthéro-alcoolique donne, après évaporation du solvant, une fraction insoluble dans l'eau et dans l'éther. Cette substance est dissoute dans le chloroforme et la solution passée sur filtre Seitz. Le produit est ensuite chromatographié sur colonne d'acide silicique, on obtient une seule fraction principale élue par le mélange chloroforme-méthanol (95:5). Le trisilicate de magnésium semble séparer plusieurs fractions. Une première chromatographie est effectuée sur trisilicate de magnésium activé par chauffage à 110° pendant 4 heures.

- le chloroforme élue 35 % du produit initial : *fraction II_a*.
- le solvant chloroforme-méthanol (95:5) élue 40 % du produit initial : *fraction II_b*.

La purification chromatographique des fractions II_a et II_b a été effectuée sur trisilicate de magnésium activé une heure à 150° après lavage à l'eau, éther et méthanol, selon Smith et coll. (4). Le tableau 18 schématise ces opérations.

Tableau 18
Purification du Mycoside C₂ (souche 802)



Les courbes d'élution des chromatographies III_a et III_b sont représentées sur les figures 18 et 19.

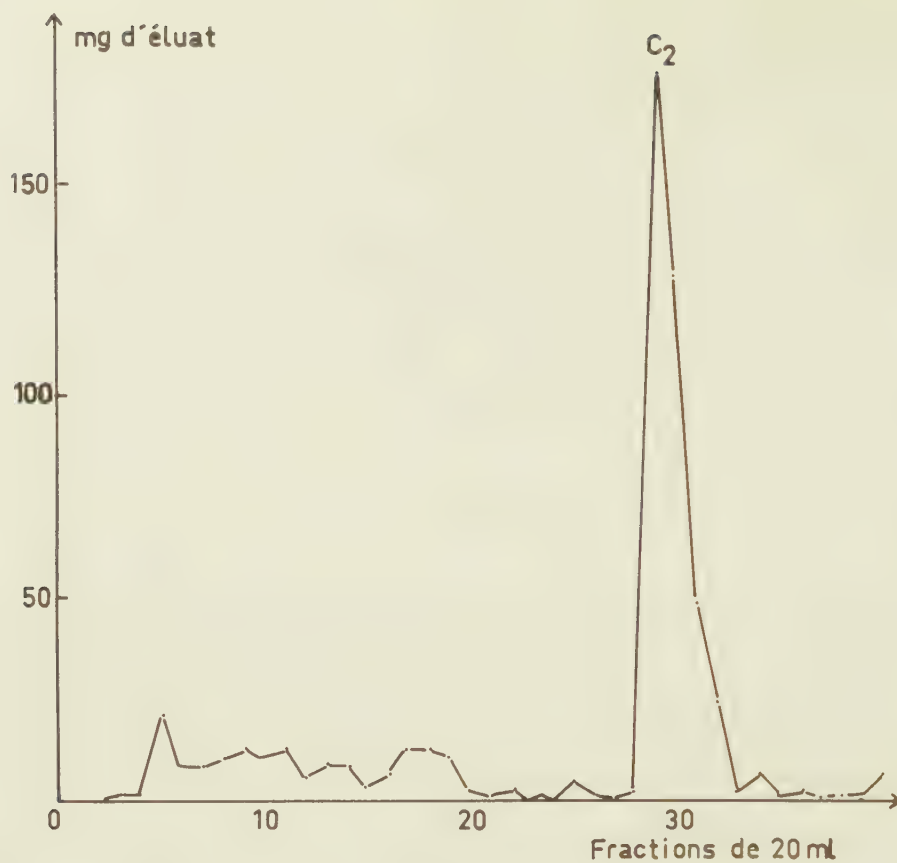


Figure 18 - Courbe d'élution du mycoside C_2 (souche 802).

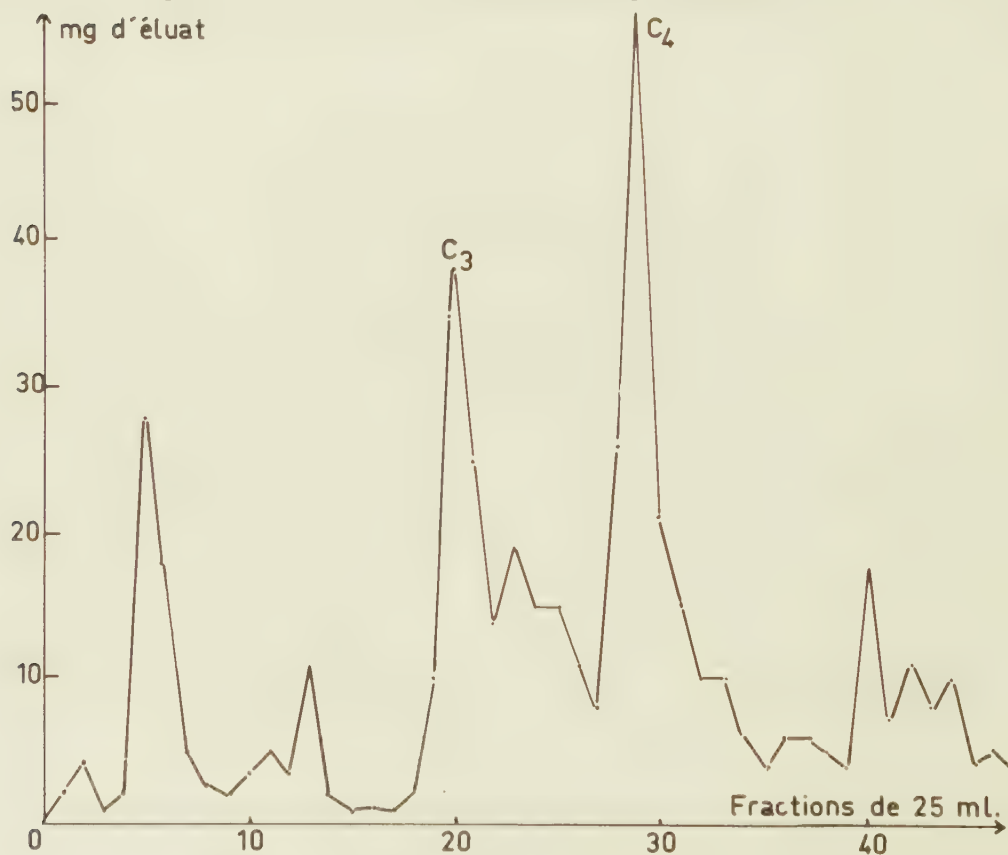


Figure 19 - Courbes d'élution des fractions C_3 et C_4 .

Les analyses des fractions C₂, C₃, C₄ sont très voisines, les résultats sont indiqués dans le tableau 19.

Tableau 19

Fractions	F	[α] _D (CHCl ₃)	Analyses			(O)-CH ₃	(CO)-CH ₃
			C	H	N		
C ₂	200°	-28°	65,56	9,37	4,25	2,73	2,25
			65,81	9,38		2,63	2,51
C ₃	190°-197°	-21°	64,82	9,51	4,30	2,69	-
						2,62	
C ₄	194°-198°	-30°	64,11	9,21	4,04	2,14	-
			64,04	9,39			

Le mycoside C₂ a été étudié : F. 200°, [α]_D = -28° (CHCl₃). Le spectre infra-rouge (figure 20), pratiquement identique à celui du mycoside C (figure 3) possède les bandes correspondant à la liaison peptidique : 3,10 μ et 6,17 μ , et au groupement acétyle : 8,15 μ .

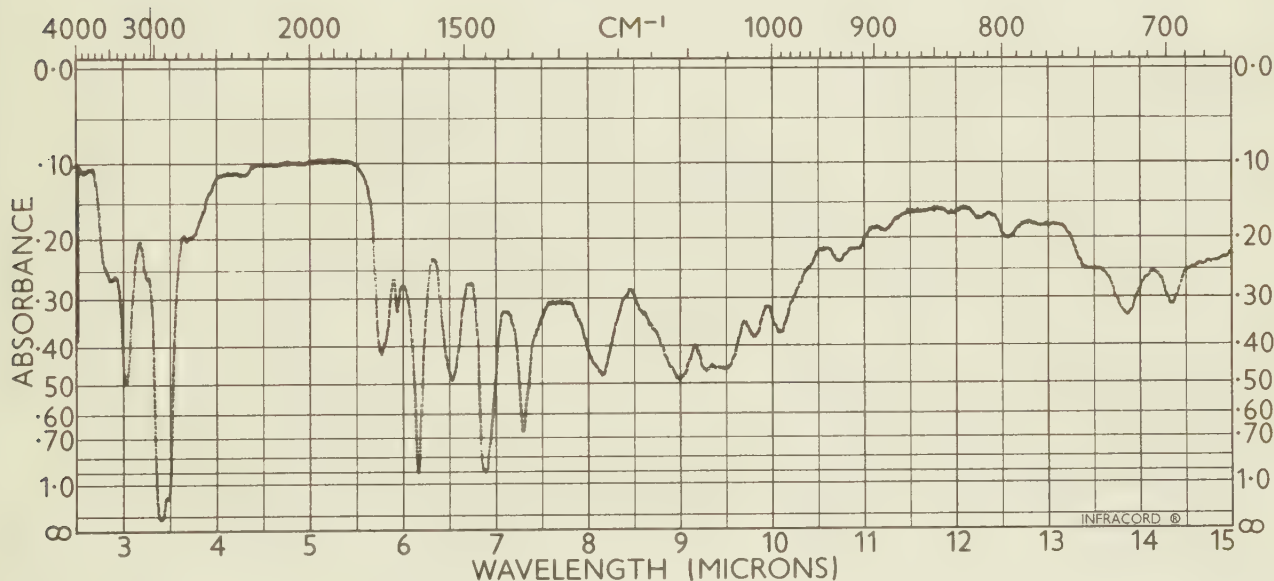


Figure 20 - Spectre d'absorption infra-rouge du mycoside (802) dans le KBr (Perkin-Elmer)

Le spectre ultra-violet présente un maximum d'absorption à 264 m μ (ϵ = 1140 dans le chlorure de méthylène). (figure 21)

II - ETUDE DES CONSTITUANTS GLUCIDIQUES.

A - Nature des sucres.

Les sucres sont recherchés dans l'extrait aqueux obtenu après hydrolyse chlorhydrique selon Mac Lennan et coll. (6). La chromatographie sur papier sépare trois oses : S_1 , S_2 et S_3 . Ce sont des 6-désoxyhexoses, la réaction de Dische et Shettles (91) est positive ; les courbes d'absorption sont identiques pour S_1 , S_2 , S_3 et pour le rhamnose témoin (figure 22).

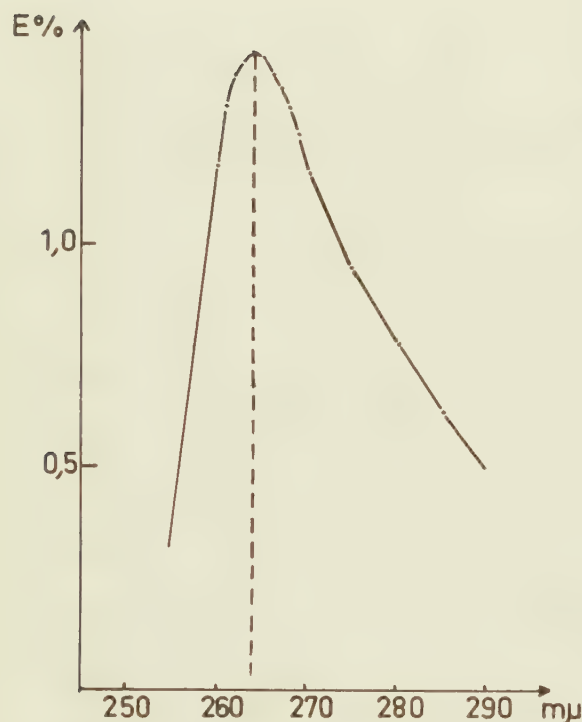


Figure 21 - Spectre d'absorption ultra-violet du mycoside C_2 (802) dans le chlorure de méthylène.

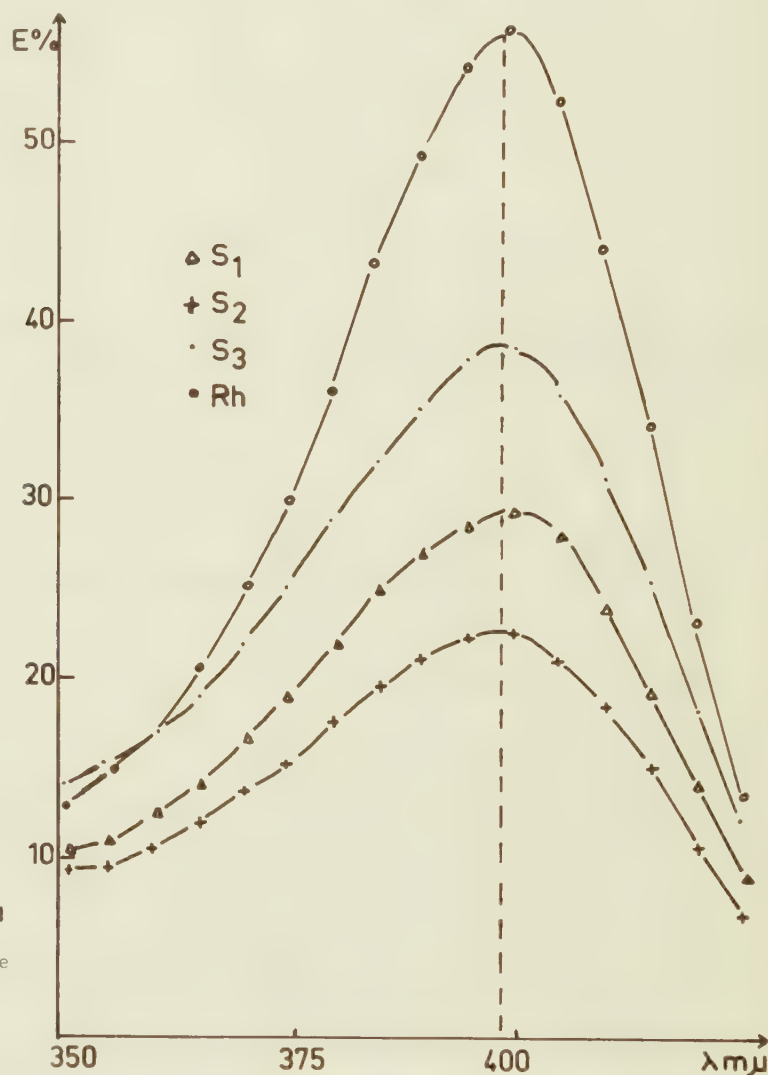


Figure 22 - Spectres d'absorption de S_1 , S_2 , S_3 et du rhamnose témoin en milieu cystéine-sulfurique (spectrophotomètre Jouan).

Par chromatographie dans plusieurs solvants, S_1 est identifié au 6-désoxytalose, S_2 au 3-O-méthyl-6-désoxytalose et S_3 au 3, 4-di-O-méthylrhamnose. Après révélation par le phtalate d'aniline, on note les R_f indiqués dans le tableau 20.

Tableau 20

Valeurs de R_f de 6-désoxyhexoses et de leurs éthers méthyliques

Solvants	R_f	
	1	2
2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose	0,85	0,82
2, 4, 6-tri-O-méthylglucose	0,77	0,68
3-O-méthyl-6-désoxytalose	0,73	0,60
rhamnose	0,56	0,36
6-désoxytalose	0,63	0,44
3, 4-di-O-méthylrhamnose	0,80	0,74
hydrolysats	0,62	0,44
	0,72	0,60
	0,80	0,73
1 butanol-pyridine-eau (6:4:3) (figure 23)		
2 butanol-éthanol-eau (5:1:4) (figure 24)		

En raison des faibles quantités disponibles, un pouvoir rotatoire précis n'a pas pu être déterminé mais le signe de la rotation observée indique qu'il s'agit des dérivés L.

B - Dosage des sucres.

Le dosage de chaque sucre est effectué sur 0,137 micromole de mycoside (en admettant un poids moléculaire de 1572 calculé pour la formule $C_{86}H_{149}H_5O_{20}$, § VI, chapitre III). Après chromatographie sur papier et spectrophotométrie de l'éluat :

trouvé : S_1 0,08 μ mole
 S_2 0,075 μ mole
 S_3 0,14 μ mole

Il y a donc sensiblement pour une mole de mycoside C_2 , 1 mole de S_3 , 0,5 mole de S_1 et 0,5 mole de S_2 .

C - Mode de liaison des sucres.

Le mycoside est saponifié par la potasse méthanolique 0,45 N pendant une heure à température ordinaire ; on obtient une fraction hydrosoluble qui renferme les deux sucres S_1 et S_2 . Le 6-désoxytalose et le 3-O-méthyl-6-désoxytalose sont donc vraisemblablement fixés sur le peptidolipide par une liaison ester. Cette même liaison est coupée par l'hydroxylamine (110) et par $NaBH_4$ en milieu alcalin (111). Dans ce dernier cas, on obtient les alcools correspondant au 6-désoxy-L-talose et au 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose non révélables par le phtalate d'aniline, révélés par le système périodate-benzidine et dont les R_f sont voisins de S_1 et S_2 .

Ces résultats prouvent que S_1 et S_2 sont liés sous forme d'esters par leur groupement pseudoaldéhydrique aux carboxyles disponibles du mycoside. S_3 qui n'est pas libéré dans les conditions précédentes est lié par une liaison osidique vraie. Nous avons recherché la présence éventuelle d'un diholoside formé de deux sucres S_1 et S_2 . Dans tous les cas : saponification, action de l'hydroxylamine, on obtient deux sucres distincts et aucun diholoside ; $NaBH_4$ donne également les deux alcools correspondants. La présence d'un diholoside est exclue.



Figure 23

- 1) 3, 4-di-O-méthylrhamnose
- 2) 2, 4, 6-tri-O-méthylglucose
- 3) 3-O-méthyl-6-désoxytalose
- 4) 2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose
- 5) sucres méthylés du mycoside C₂
- 6) rhamnose

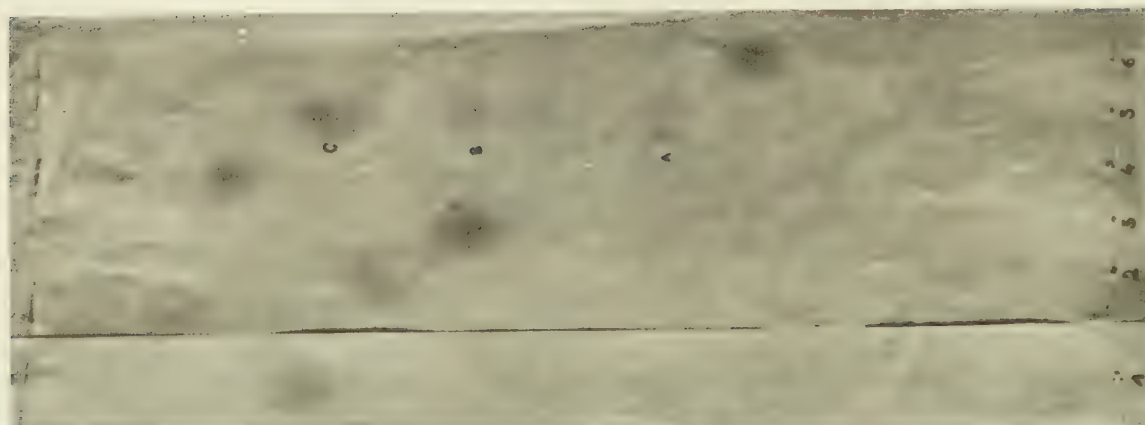


Figure 24

- 1) 6-désoxytalose
3, 4-di-O-méthylrhamnose
- 2) 2, 4, 6-tri-O-méthylglucose
- 3) 3-O-méthyl-6-désoxytalose
- 4) 2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose
- 5) sucres méthylés du mycoside C₂
- 6) rhamnose

III - ETUDE DES CONSTITUANTS AMINES.

La recherche des substances aminées par chromatographie mono- et bidimensionnelle sur papier avec plusieurs solvants a permis d'identifier trois acides aminés : *allo*-thréonine, alanine et phénylalanine. Les résultats sont indiqués dans le tableau 21.

Tableau 21

Valeurs de R_f des acides aminés du mycoside C_2 (souche 802) et des trois acides aminés témoins : thréonine, alanine et phénylalanine

Solvants	R_f	
	1	2
thréonine	0.25	0.36
alanine	0.29	0.52
phénylalanine	0.59	0.72
hydrolysats	0.24	0.32
	0.30	0.47
	0.59	0.72

1 butanol-acide acétique-eau (65:10:25)

2 phénol-eau (80-20)

Ces résultats ont été confirmés par chromatographie quantitative sur colonne d'Amberlite CG 120 selon Spackman et coll. (79). On obtient les proportions molaires suivantes : *allo*-Thr : 2, Ala : 2, Phe : 1. La figure 25 représente la courbe obtenue.

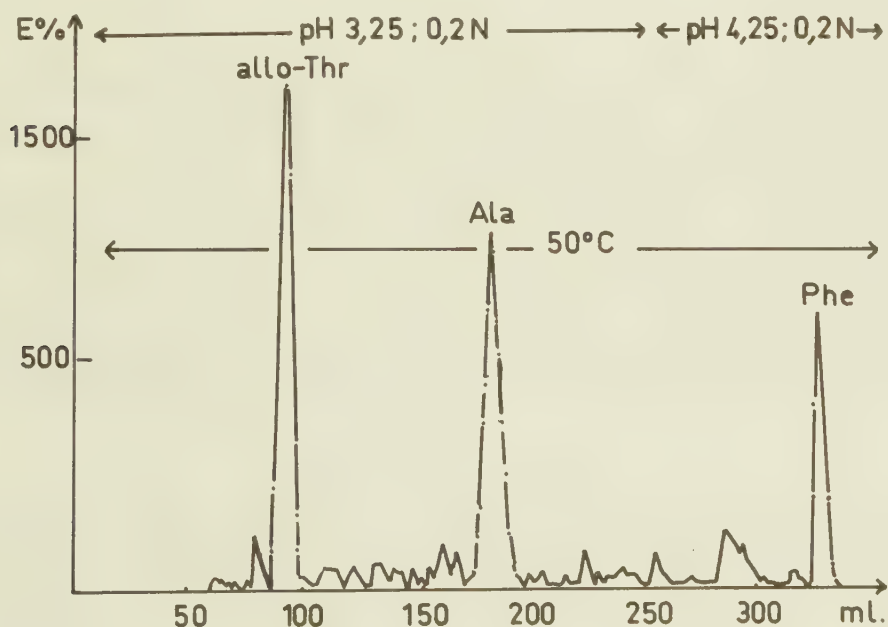


Figure 25 - Chromatographie sur colonne d'Amberlite CG 120 de l'hydrolysats total du mycoside C_2 (souche 802).

Par chromatographie sur papier avec le solvant butanol-eau-acétone-ammoniaque (8:6:1:1) (119), on a précisé qu'il s'agissait bien d'*allo*-thréonine. Les R_f sont donnés dans le tableau 22.

Tableau 22

Valeurs de R_f de la thréonine et de l'*allo*-thréonine dans le solvant
butanol-eau-acétone-ammoniaque (200:150:25:25)

DL- <i>allo</i> -thréonine	0,07
thréonine (<i>M. avium</i>)	0,07
DL-thréonine	0,125

Les essais de Ikawa et coll. (43) sur les différentes fractions de mycoside C isolées de *M. avium* ont confirmé les proportions 2:2:1 et ont montré que les acides aminés étaient tous de configuration D.

Ainsi tous les constituants de la partie glycopeptidique du mycoside C₂ sont identifiés. Pour une mole de mycoside, il y a sensiblement une mole de 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose, 1/2 mole de 6-désoxy-L-talose, 1/2 mole de 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose ; 5 moles d'acides aminés : D-Phe, D-*allo*-Thr₂, D-Ala₂ ; 3 groupements (CO)-CH₃.

Comme dans le mycoside C_m, nous remarquons la présence d'acides aminés de configuration D, en particulier de D-*allo*-thréonine, et la présence de 6-désoxyhexoses de configuration L.

IV - STRUCTURE DE LA PARTIE GLYCOPEPTIDIQUE DU MYCOSIDE C₂.

L'enchaînement peptidique et l'emplacement des sucres ont été déterminés par l'étude des produits obtenus après plusieurs hydrolyses partielles.

A - Hydrolyse partielle n° 1.

Le mycoside est hydrolysé par HCl 6 N à 37° pendant 16 heures.

1 - Partie hydrosoluble.

La partie hydrosoluble est analysée par chromatographie sur papier. On observe deux taches importantes de R_f 0,31 et 0,52 dans le solvant butanol-acide acétique-eau (65:10:25).

- La tache de R_f 0,31 apparaît en jaune à la ninhydrine, puis vire au rouge-violet. Elle correspond au peptide Pa₁.

- La tache de R_f 0,52 apparaît en rose pâle. Elle correspond au peptide Pb₁. Il n'y a pas d'acides aminés libres et seulement des traces de sucres.

L'hydrolyse totale du peptide Pa₁ et le dosage des amino-acides obtenus donne : *allo*-Thr : 1, Ala : 1. La coloration jaune à la ninhydrine de Pa₁ indique que l'*allo*-thréonine est N-terminale. Le R_f est identique à celui du dipeptide D-*allo*-Thr-D-Ala obtenu après hydrolyse partielle du mycoside C_m.

Pa₁ est le dipeptide D-*allo*-Thr-D-Ala

Pb₁ a été soumis à une hydrolyse totale par HCl 6 N et à une hydrolyse ménagée par HCl N. Après chromatographie sur papier et révélation à la ninhydrine, on observe la présence de trois acides aminés : Phe, *allo*-Thr, Ala. Après révélation par le phtalate d'aniline on obtient les trois sucres : S₁, S₂ et S₃. Pb₁ est vraisemblablement le glycopentapeptide présent initialement dans le mycoside C₂. Les faibles quantités obtenues n'ont pas permis une étude plus approfondie. Toutefois l'obtention de ce glycopeptide permet de préciser que les trois oses S₁, S₂ et S₃ sont fixés sur la partie peptidique et non sur la partie lipidique du mycoside.

2 - Partie éthersoluble.

La fraction éthersoluble provenant de l'hydrolyse partielle est soumise à une hydrolyse totale. La chromatographie sur papier donne les trois acides aminés : Phe, *allo*-Thr et Ala. Le dosage sur Amberlite CG 120 indique les rapports molaires suivants : Phe : 1, *allo*-Thr : 1, Ala : 1.

La figure 26 représente la courbe obtenue.

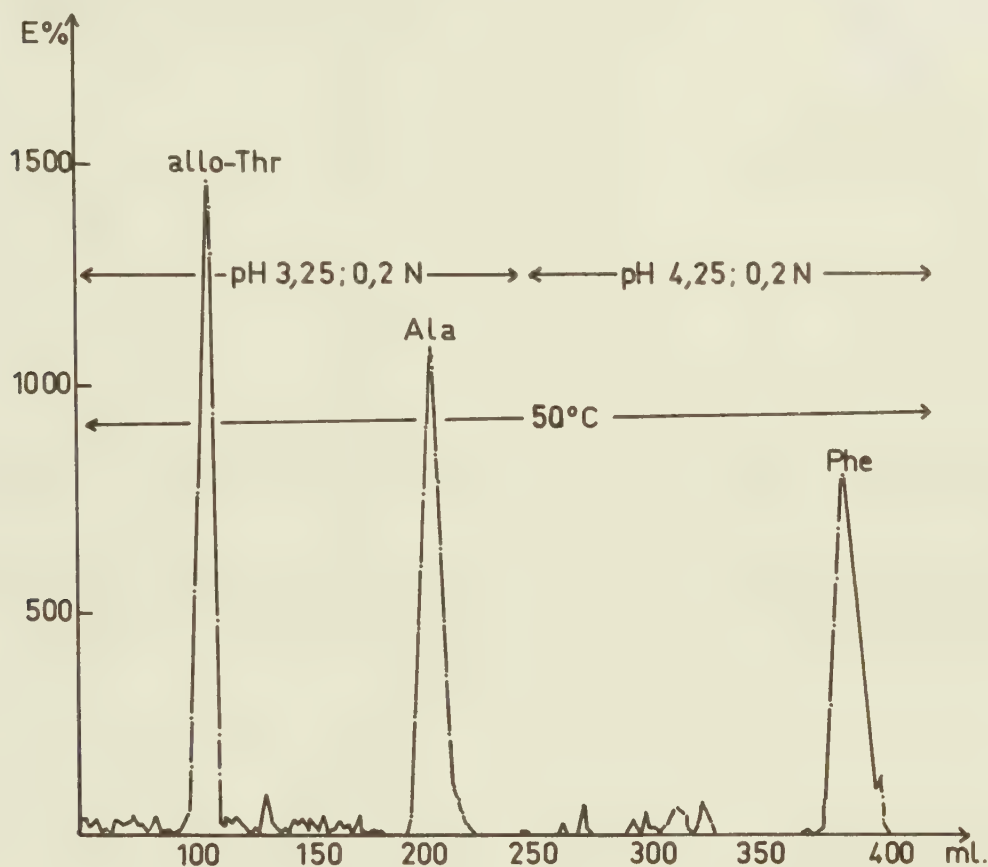


Figure 26 - Chromatographie sur colonne d'Amberlite CG 120 de l'hydrolysats total du lipide azoté obtenu après hydrolyse partielle du mycoside C₂ (souche 802).

D'autre part, ce lipide azoté a été soumis à deux hydrolyses ménagées successives.

La fraction hydrosoluble provenant de la deuxième hydrolyse renferme uniquement la phénylalanine. On peut donc, comme dans le mycoside C_m, conclure à l'existence d'une liaison amide entre un carboxyle de la partie lipidique et le groupement -NH₂ de la phénylalanine.

Lipide-CO-NH-Phe.

La première hydrolyse est effectuée par HCl 12 N à 37° pendant 16 heures. L'hydrolysats est analysé par chromatographie sur papier. Le tableau 23 indique les résultats obtenus dans le solvant acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3).

Tableau 23

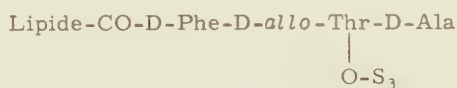
Résultats d'hydrolyse ménagée du lipide azoté provenant de l'hydrolyse partielle n° 1 du mycoside C₂ (souche 802)

Solvant : acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3)

Produit	R _f	ninhydrine	phtalate
Thréonine	0,34	violet	-
Alanine	0,39	violet	-
Phénylalanine	0,63	violet	-
D- <i>allo</i> -Thr-D-Ala	0,43	jaune → rouge violet	-
S ₃	0,78	-	+
hydrolysats	0,43	jaune → rouge violet	-
	0,61	violet	-
	0,78	-	+

La tache de R_f 0,43 est le dipeptide D-*allo*-Thr-D-Ala. L'examen visuel des chromatogrammes donne des proportions sensiblement équimoléculaires pour la phénylalanine et le 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose (taches de R_f 0,61 et 0,78).

L'obtention de phénylalanine et de 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose après hydrolyse ménagée du lipide azoté indique que le sucre S₃ est lié à l'hydroxyle de l'*allo*-thréonine voisine de la phénylalanine. En effet, l'hydrolyse ménagée par HCl 12 N a scindé la liaison osidique en libérant -OH de l'*allo*-thréonine, d'où coupure de la liaison peptidique Phe-*allo*-Thr. Le lipide azoté obtenu après l'hydrolyse partielle n° 1 a donc la structure suivante :



B - Hydrolyse partielle n° 2.

Le mycoside est hydrolysé par HCl 10 N à 37° pendant 24 heures.

- La fraction hydrosoluble est analysée par chromatographie sur papier. On constate la présence de plusieurs peptides. Les trois sucres ont été en grande partie libérés. Il n'y a pas d'acides aminés libres. Le tableau 24 schématise les résultats de la chromatographie dans le solvant butanol-acide acétique-eau (65:10:25).

Tableau 24

Valeurs de R_f des peptides obtenus après hydrolyse partielle n° 3 du mycoside C₂ (souche 802)

Solvant : butanol-acide acétique-eau (65:10:25)

Peptides	R _f	coloration ninhydrine
Pa ₂	0,32	jaune → rouge-violet
Pb ₂	0,52	jaune → rouge-violet
Pc ₂	0,65	rose pâle

Les trois peptides sont isolés par chromatographie sur papier et chacun d'eux est analysé.

- Pa_2 :

L'hydrolyse totale du peptide Pa_2 et le dosage des amino-acides sur Amberlite CG 120 (79) donne *allo*-Thr : 1, Ala : 1.

La figure 27 représente la courbe obtenue.

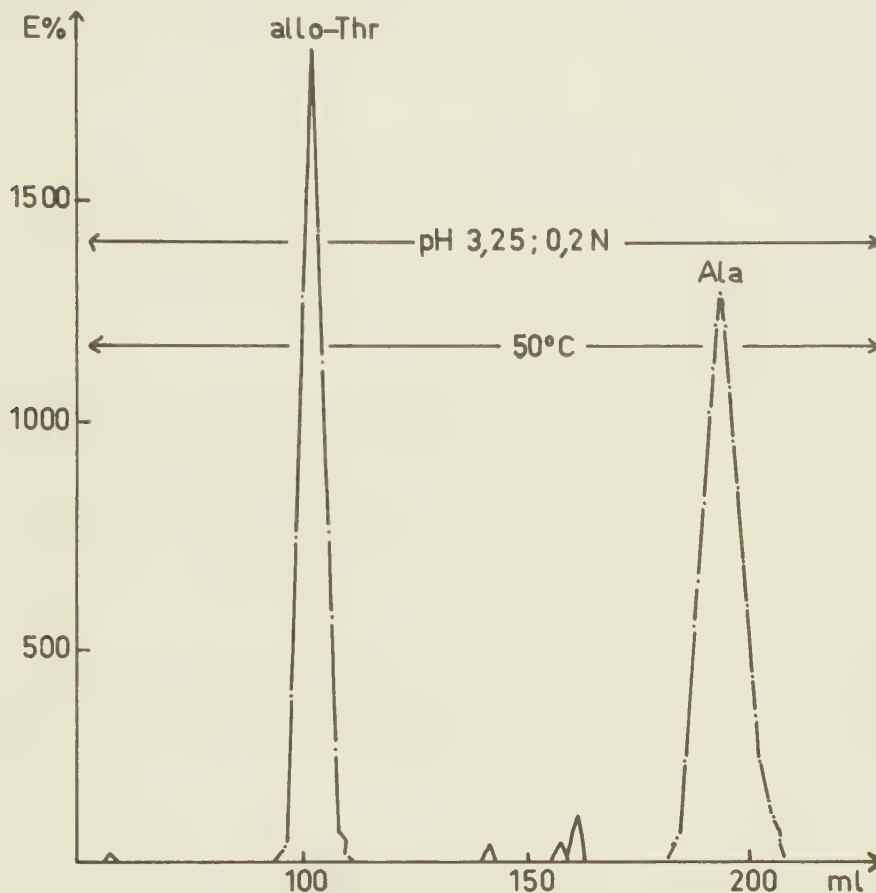


Figure 27 - Chromatographie sur colonne d'Amberlite CG 120 de l'hydrolysats total du peptide P_{2a} .

Ce peptide révélabl par le système périodate-benzidine a même composition et même R_f que le peptide Pa_1 isolé précédemment et il donne la même coloration à la ninhydrine. Pa_2 est le dipeptide D-*allo*-Thr-D-Ala.

- Pb_2 :

Pb_2 a été soumis en partie à une hydrolyse totale, en partie à une hydrolyse ménagée. L'hydrolyse totale par HCl 6 N et le dosage des acides aminés obtenus donne *allo*-Thr : 1, Ala : 1.

L'hydrolyse ménagée est effectuée par HCl 12 N à 37° pendant 24 heures. On observe trois taches 1, 2, 3 dont l'une révélabl à la ninhydrine et les deux autres au phtalate d'aniline. Dans le solvant butanol-acide acétique-eau (65:10:25) ; on a les résultats indiqués dans le tableau 25.

Tableau 25

Valeurs de R_f des produits d'hydrolyse du peptide Pb_2

Solvant : butanol-acide acétique-eau (65:10:25)

Produit	R_f	ninhydrine	phtalate
Pa_2	0,33	jaune	-
S_1	0,44	-	+
S_2	0,62	-	+
Pb_2 hydrolysé	1 0,32	jaune	-
	2 0,44	-	+
	3 0,62	-	+

On note la libération du dipeptide D-*allo*-Thr-D-Ala (tache 1) du 6-désoxy-L-talose (tache 2), du 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose (tache 3) en proportions voisines de 2:1:1.

Interprétation des résultats.

Le glycopeptide Pb_2 contient les deux sucres S_1 et S_2 et possède l'enchaînement *allo*-Thr-Ala. La coloration jaune obtenue après révélation à la ninhydrine indique que l'*allo*-thréonine est N-terminale (114). L'alanine est l'acide aminé C-terminal. Nous avons montré précédemment que dans le mycoside C_2 initial, S_1 et S_2 étaient fixés sur le peptidolipide par une liaison ester et qu'ils ne formaient pas un diholoside. Or dans le glycopeptide Pb_2 , l'alanine possède le seul groupement carboxylique disponible. Dans ces conditions, Pb_2 est un mélange de deux glycopeptides :



Pc_2 :

L'hydrolyse totale du peptide Pc_2 donne les trois acides aminés : Phe, *allo*-Thr, Ala, d'intensité sensiblement égale. La faible quantité du peptide Pc_2 n'a pas permis de l'étudier davantage.

La partie éthérosoluble provenant de cette deuxième hydrolyse partielle s'est révélée identique au lipide azoté provenant de l'hydrolyse partielle n° 1.

C - Hydrolyse partielle n° 3.

Le mycoside C_2 est hydrolysé par HCl 10 N à 37° pendant 16 heures.

1 - Partie hydrosoluble.

Après chromatographie sur papier, on note la présence de deux peptides, du 6-désoxy-L-talose et du 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose. Il n'y a pas d'acides aminés libres et peu de 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose.

Dans le solvant butanol-acide acétique-eau (65:10:25), on a les résultats indiqués dans le tableau 26.

Tableau 26

Valeurs de R_f des peptides Pa_3 et Pb_3

Solvant : butanol-acide acétique-eau (65:10:25)

Peptides	R_f	coloration ninhydrine
Pa_3	0,31	jaune → rouge-violet
Pb_3	0,51	rose-violet

Le peptide Pa_3 a même composition et même R_f que les peptides Pa_1 et Pa_2 isolés précédemment. Il donne la même coloration à la ninhydrine, c'est le dipeptide D-*allo*-Thr-D-Ala. Nous avons montré que l'alanine était bien l'acide aminé C-terminal. Après réaction de Dakin-West (120) selon la technique de Shepherd (121), on ne retrouve que la thréonine.

Le peptide Pb_3 a été étudié :

- Une hydrolyse totale par HCl 6 N montre qu'il renferme en proportions équimoléculaires les acides aminés *allo*-Thr- et Ala.

- Une hydrolyse ménagée est effectuée par HCl 12 N à 37° pendant 18 heures. Les résultats de la chromatographie dans butanol-acide acétique-eau (65:10:25) sont mentionnés dans le tableau 27.

Tableau 27

Valeurs de R_f des produits d'hydrolyse du peptide Pb_3

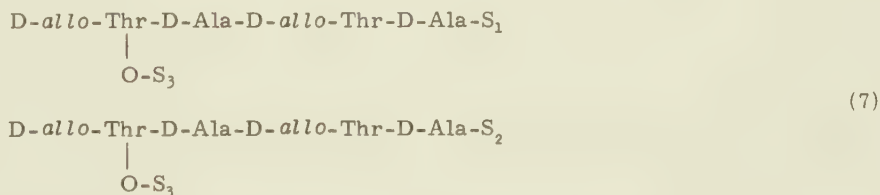
Solvant : butanol-acide acétique-eau (65:10:25)

Produit	R_f	ninhydrine	phtalate
Pb_3 hydrolysé	1 0,34	jaune	-
	2 0,47	-	+
	3 0,66	-	+
	4 0,78	-	+
Pb_3 initial	0,55	rose-violet	-
Pa_3	0,34	jaune	-
S_2	0,65	-	+
S_3	0,77	-	+

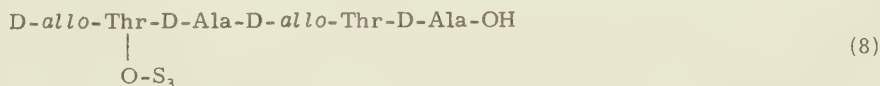
L'hydrolyse partielle de Pb_3 a donc donné un dipeptide identique à Pa_3 , le 6-désoxy-L-talose, le 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose, le 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose.

Interprétation des résultats.

Pb_3 a l'enchaînement *allo*-Thr-Ala. C'est un glycopeptide contenant les trois sucres S_1 , S_2 et S_3 . Nous savons déjà que le 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose est lié à l'hydroxyle de l'*allo*-thréonine voisine de la phénylalanine, et que les deux autres sucres sont fixés sur le carboxyle de l'alanine. Dans ces conditions, on peut considérer Pb_3 comme un mélange de deux glycopeptides :



D'autre part, après saponification de Pb_3 dans des conditions très douces (KOH éthanolique 0,05 N à 37° pendant 17 heures) on obtient un nouveau glycopeptide Pb_4 :



Il ne contient que S_3 , les sucres S_1 et S_2 liés par une fonction ester étant libérés.

Après réaction de Dakin-West (120) sur ce glycopeptide obtenu par chromatographie préparative, on retrouve les acides aminés dans les rapports suivants : *allo*-Thr : 2, Ala : 1. Ceci

est en accord avec les formules (7) et (8). Il faut noter que Pb_4 a un R_f voisin du glycopeptide D-*allo*-Thr-D-Ala-D-*allo*-Thr-D-Ala isolé après hydrolyse partielle du mycoside C_2 , mais il ne présente pas la même coloration à la ninhydrine. Ce résultat s'explique par la position du 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose qui, dans Pb_4 , est lié à l'hydroxyle de l'*allo*-thréonine N-terminale.

L'obtention du glycopeptide Pb_3 renfermant les trois sucres S_1 , S_2 et S_3 montre que ceux-ci sont bien liés à la partie peptidique et non à la partie lipidique et confirme les résultats de l'étude du peptide Pb_1 .

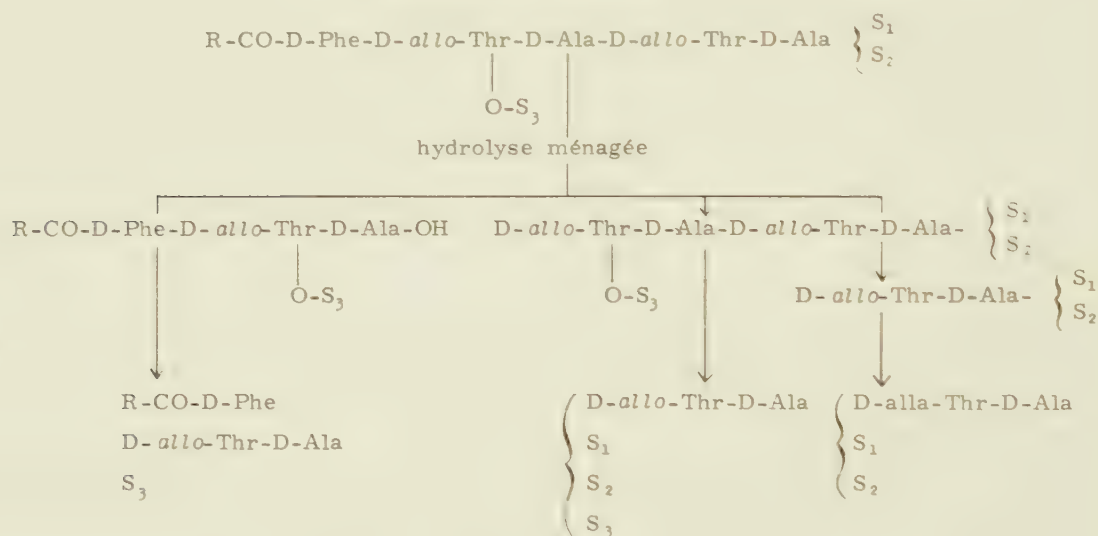
2 - Partie éthérosoluble.

L'hydrolyse partielle n° 3 fournit une partie lipidique R-CO-D-Phe identique à celles déjà obtenues précédemment.

D'autre part après hydrolyse plus poussée, en milieu anhydride acétique-pyridine à 150°, nous avons mis en évidence par réaction de Dakin-West selon la technique de Turner et Schmerzler (122), la cétone aminée dérivant de la phénylalanine, identifiée par chromatographie sur papier.

Les résultats des différentes hydrolyses ménagées sont résumées dans le tableau 28.

Tableau 28
Hydrolyse du mycoside C_2



V - POSITION DES GROUPEMENTS ACÉTYLES.

Le spectre infra-rouge du mycoside C_2 (figure 20) permet de reconnaître la présence de groupements acétyles. Le dosage indique 3(CO)-CH₃ par mole de mycoside. La méthylation du mycoside C_2 est effectuée par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent dans le diméthylformamide (112).

Après hydrolyse du produit méthylé et chromatographie, on obtient deux taches, l'une correspond au 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose et la deuxième à un dérivé monométhylé du 6-désoxy-L-talose. Les R_f sont indiqués dans le tableau 29.

Tableau 29

Valeurs de R_f de 6-désoxyhexoses et de leurs dérivés O-méthylés

Solvant : acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3)

rhamnose	0,40		
3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose		0,76	
2, 3, 4, 6-tétra-O-méthylglucose			0,88
2, 4, 6-tri-O-méthylglucose		0,72	
6-désoxy-L-talose	0,47		
3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose		0,65	
2-O-méthylfucose	0,55		
hydrolysats		0,65	0,78

On note donc l'absence d'un dérivé tri-O-méthylé du rhamnose ce qui montre que le di-O-méthyl-L-rhamnose est acétylé dans le mycoside initial.

Les deux autres molécules d'acide acétique sont fixées sur S_1 et S_2 .

En ce qui concerne S_2 (3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose) les deux groupes acétyles ne peuvent être fixés que sur les (OH) 2 et 4. On peut admettre qu'ils occupent la même position dans S_1 (6-désoxy-L-talose).

Il est remarquable de constater que dans les mycosides C trois moyens sont utilisés à la fois pour rendre les sucres lipophiles, réduction en CH_3 du CH_2OH en 6, O-méthylation et O-acétylation.

VI - PARTIE LIPIDIQUE.

Les fractions lipidiques acides obtenues après hydrolyse prolongée du mycoside C_2 se présentent sous l'aspect d'un solide brun, presque liquide, dont l'étude s'avère difficile. Il est possible que l'hydrolyse totale détruise partiellement la partie lipidique. Sa formule brute approximative est déduite de l'analyse.

L'analyse élémentaire du mycoside C_2 donne :

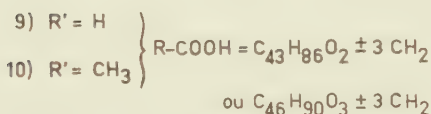
	% C	65,56	H	9,37	N	4,25
		65,81		9,38		
calculé pour $C_{86}H_{149}N_5O_{20}$	% C	65,66	H	9,55	N	4,45
calculé pour $C_{89}H_{153}N_5O_{21}$	% C	65,61	H	9,46	N	4,30

La partie glycopeptidique triacétylée correspond à $C_{43}H_{65}N_5O_{19}$ (avec le sucre S_1), ce qui permet d'envisager pour la partie lipidique des formules allant de $C_{43}H_{86}O_2 \pm 3CH_2$ à $C_{46}H_{90}O_3 \pm 3CH_2$.

Le poids moléculaire calculé pour la formule $C_{86}H_{149}N_5O_{20}$ est de 1572,5 en assez bon accord avec les valeurs de 1450 ± 150 déterminées précédemment pour des fractions analogues (123).

VII - FORMULE DU MYCOSIDE C_2 .

Les résultats précédents montrent que le mycoside C_2 est en réalité un mélange de deux mycosides homologues C_{2a} (formule 9) et C_{2b} (formule 10). Ils ont la même séquence peptidique et une molécule de 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose fixée sur l'*allo*-thréonine voisine de la phénylalanine. L'alanine C-terminale estérifie la fonction pseudo-aldéhydrique du 6-désoxy-L-talose dans le mycoside C_{2a} et du 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose dans le mycoside C_{2b} .



formule 10

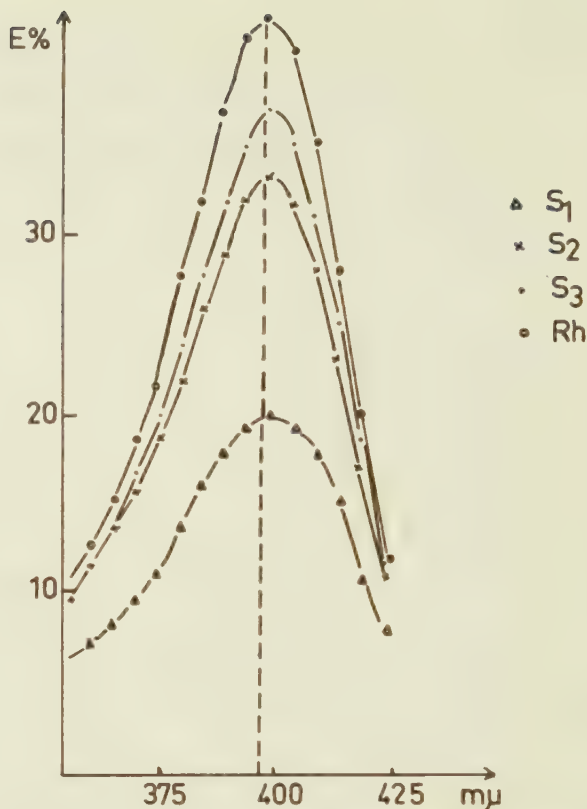


Figure 28 - Spectres d'absorption des sucres du mycoside C₂ (souche "faisan") et du rhamnose témoin en milieu cystéine-sulfurique.

VIII - ETUDE DU MYCOSIDE C₂ de M. AVIUM, SOUCHE "FAISAN"^(*).

Nous avons isolé avec les techniques exposées précédemment un mycoside C₂ d'une souche "faisan" de *M. avium*. La faible quantité dont nous disposons n'a pas permis une étude approfondie. Cependant l'analyse des produits après hydrolyse acide et alcaline a confirmé les résultats de structure obtenus avec le mycoside C₂ de *M. avium*, souche 802.

A - Etude des constituants glucidiques.

1 - Nature et dosage des sucres.

La chromatographie sur papier de l'extrait aqueux après hydrolyses chlorhydriques répétées selon Mac Lennan (6) sépare trois oses S_1 , S_2 , S_3 . Les courbes d'absorption en milieu cystéine-acide sulfurique identiques pour S_1 , S_2 , S_3 et pour le rhamnose témoin montrent que ce sont des 6-désoxyhexoses (figure 28).

Dans plusieurs solvants, S₁ est identifié au 6-désoxytalose, S₂ au 3-O-méthyl-6-désoxytalose et S₃ au 3, 4-di-O-méthylrhannose.

Le dosage par spectrophotométrie après hydrolyse selon Mac Lennan donne 19 % de sucres totaux.

Le dosage de chaque sucre est effectué après chromatographie sur papier, élution et spectrophotométrie. S_2 et S_3 sont en proportions équimoléculaires. S_1 existe à l'état de traces. Nous avons ainsi identifié les mêmes sucres que ceux des mycosides C_{2a} et C_{2b} isolés de la souche aviaire 802 ; S_2 et S_3 correspondant au mycoside C_{2b} étant prépondérants.

D'autre part, nous avons isolé dans les fractions chromatographiques voisines, le 3-O-méthylrhannose, à l'état de traces.

(*) Nous remercions Monsieur le Professeur Cl. Fougeas (Marseille) qui nous a procuré la souche "faisan" de *Mycobacterium avium*.

2 - Mode de liaison des sucres.

La saponification donne une fraction hydrosoluble qui renferme le 6-désoxytalose et le 3-O-méthyl-6-désoxytalose. Il n'y a pas libération du 3, 4-di-O-méthylrhamnose, ni du 3-O-méthylrhamnose. Ces résultats permettent de conclure que le 6-désoxytalose et son dérivé 3-O-méthylé sont fixés sur le peptidolipide par une liaison ester tandis que les dérivés du rhamnose sont liés par une liaison osidique vraie.

B - Etude des constituants aminés.

Trois acides aminés sont décelés par chromatographie sur papier : thréonine, alanine et phénylalanine.

L'analyse enzymatique (43) et la chromatographie sur colonne d'Amberlite CG 120 selon Spackman et coll. (79) ont permis d'en préciser la nature et les proportions molaires ; il s'agit de D-*allo*-thréonine, de D-alanine et de D-phénylalanine dans le rapport : 2:2:1. La figure 29 représente la courbe obtenue.

La chromatographie sur papier avec le solvant butanol-eau-acétone-ammoniaque (8:6:1:1) (119), confirme la présence de l'*allo*-thréonine (figure 30).

C - Structure de la partie glycopeptidique.

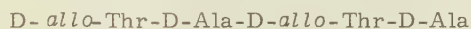
40 mg de produit sont hydrolysés par HCl 10 N à 37° pendant 24 heures.

La fraction hydrosoluble est analysée par chromatographie sur papier dans le solvant butanol-éthanol-eau (5:1:4). Les taches les plus importantes correspondent au 3-O-méthyl-6-désoxytalose, au 3, 4-di-O-méthylrhamnose et à trois peptides P₁, P₂ et P₃. Ces derniers ont été isolés par chromatographie préparative sur papier et chacun d'eux a été soumis d'une part à une hydrolyse totale, d'autre part à une hydrolyse ménagée.

- P₁ a même R_f et même composition que le dipeptide D-*allo*-Thr-D-Ala déjà obtenu par hydrolyse partielle des mycosides C_m et C₂.

- P₂ réagit avec la ninhydrine, mais n'est pas révétable par le phtalate d'aniline, il ne renferme donc aucun sucre libre. L'hydrolyse ménagée de P₂ libère le dipeptide D-*allo*-Thr-D-Ala et le 3-O-méthyl-6-désoxytalose identifiés par chromatographie sur papier. Nous savons déjà que ce dernier est fixé sur le peptidolipide par une liaison ester. Il est donc lié au carboxyle libre de l'alanine. Dans ces conditions, nous sommes en présence du glycopeptide D-*allo*-Thr-D-Ala-S₂ qui a déjà été isolé et identifié dans le mycoside C_{2b} de la souche aviaire 802.

- P₃ renferme en proportions équimoléculaires les acides aminés *allo*-Thr et Ala. Son comportement chromatographique est celui d'un tétrapeptide, R_f = 0,60 dans le solvant butanol-acide acétique-eau (65:10:25). L'hydrolyse ménagée donne uniquement le dipeptide D-*allo*-Thr-D-Ala. P₃ est donc le tétrapeptide :



La partie éthérosoluble provenant de l'hydrolyse partielle soumise à une nouvelle hydrolyse donne le dipeptide D-*allo*-Thr-D-Ala, le 3, 4-di-O-méthylrhamnose et la phénylalanine. Une nouvelle hydrolyse dans des conditions plus énergiques libère uniquement la phénylalanine. Cet amino-acide, comme dans les autres mycosides, est donc lié au lipide par une liaison amide.

Ces résultats permettent d'écrire l'enchaînement peptidique :



dans lequel l'alanine C-terminale estérifie la fonction pseudo-aldéhyde du 3-O-méthyl-6-désoxytalose. Ainsi la séquence glycopeptidique du mycoside C_{2b} identifié dans la souche aviaire 802, se retrouve dans le mycoside C₂ isolé de *M. avium* souche "faisan".

Nous n'avons pas pu préciser la position de S₃ avec la faible quantité du produit disponible. Cependant l'isolement après hydrolyse acide ménagée du glycopeptide : D-*allo*-Thr-D-Ala-S₂ est en faveur de l'existence dans le mycoside initial d'une molécule d'*allo*-thréonine avec un hydroxyde libre au voisinage de l'alanine C-terminale.

Ainsi l'étude du mycoside C₂ de *M. avium*, souche "faisan", a confirmé la séquence glycopeptidique des mycosides C_{2a} et C_{2b} de la souche aviaire 802. La fraction lipidique de ces mycosides est très complexe comme l'a montré une analyse par spectrométrie de masse. La chromatogra-

phie en couches minces sur gel de silice dans le solvant chloroforme-méthanol (96:4) a effectivement séparé plusieurs taches. L'isolement et l'hydrolyse des composés correspondants donnent dans tous les cas les mêmes acides aminés et les mêmes sucres. Ces composés diffèrent donc par la nature de la partie lipidique. On peut attribuer au mycoside C₂, caractéristique de *M. avium*, la séquence glycopeptidique indiquée précédemment (tableau 28).

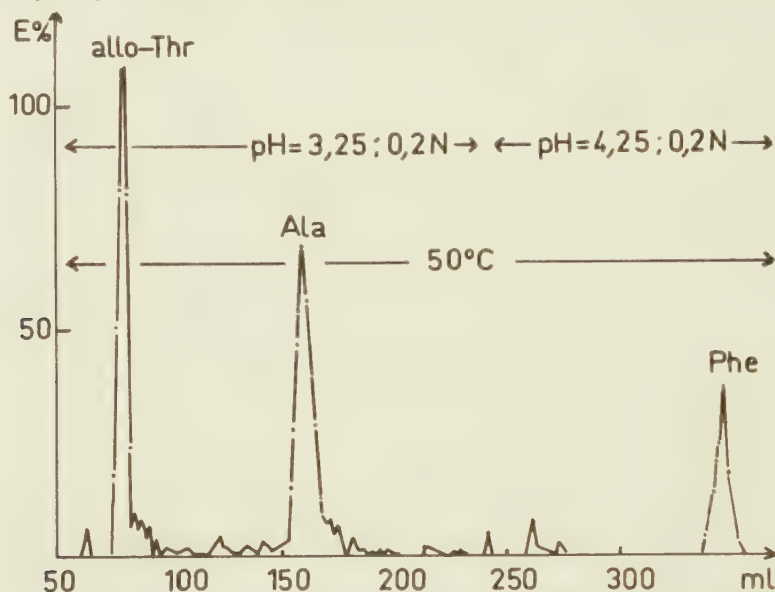


Figure 29 - Chromatographie sur colonne d'Amberlite CG 120 de l'hydrolysât total du mycoside C₂ ("faisan").



Figure 30

- 1) D-*allo*-thréonine (souche 802)
- 2) D-*allo*-thréonine (souche 802) + thréonine "faisan"
- 3) thréonine ("faisan")
- 4) thréonine ("faisan") + DL-thréonine
- 5) DL-thréonine

CHAPITRE V

DESCRIPTION DES EXPÉRIENCES

I - OBTENTION ET PURIFICATION DES MYCOSIDES.

A - Mycoside C_m.

Mycobacterium marianum a été cultivé pendant 4 semaines sur milieu de Sauton. Les bacilles sont ensuite filtrés et lavés à l'eau distillée. On extrait les lipides selon Anderson (80) par le mélange alcool-éther (1:1), puis par le chloroforme. L'extrait éthéro-alcoolique, après évaporation des solvants, donne une fraction insoluble dans l'éther et dans l'eau. Cette fraction lipidique contient le mycoside C_m.

Après passage sur filtre Seitz puis sur colonne de poudre de cellulose, le mycoside brut est purifié par chromatographie sur colonne de trisilicate de magnésium activé.

Chromatographie n° 1

5 g de mycoside C_m sont dissous dans 10 ml de chloroforme et chromatographiés sur une colonne de 150 g de trisilicate de magnésium activé par chauffage à 120° pendant 25 heures et de 75 g de célite 545. Elution par fraction de 100 ml. La chromatographie n° 2 est effectuée dans les mêmes conditions.

Chromatographie n° 1

<u>Fractions</u>	<u>Solvant</u>	<u>mg</u>
1	CHCl ₃	3
2	"	25
3	"	717
4	"	92
5	"	89
6	"	55
7	"	37
8	"	28
9	"	22
10	"	28
11	"	38
12	"	105
13	"	96
14	"	41
15	"	35
16	"	23
17	"	18
18	"	16
19	"	19
20	"	12
21	CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	12
22	"	14
23	"	748
24	"	485
25	"	398
26	"	102

<u>Fractions</u>	<u>Solvant</u>	<u>mg</u>
27	CHCl ₃ -OH ₃ OH (95:5)	61
28	"	29
29	"	19
30	"	16
31	"	13
32	"	14
33	"	17
34 à 44	CHCl ₃ -CH ₃ OH (90:10)	363
45 à 57	CHCl ₃ -CH ₃ OH (75:25)	391
58 à 63	CHCl ₃ -CH ₃ OH-éther (1:1:1)	35
Total....		4239 mg

Chromatographie n° 2

<u>Fractions</u>	<u>Solvant</u>	<u>mg</u>
1	CHCl ₃	6
2	"	-
3	"	212
4	"	1615
5	"	524
6	"	161
7	"	149
8	"	160
9	"	147
10	"	62
11	"	34
12	"	23
13	"	16
14	"	18
15	"	21
16	"	19
17	"	24
18	"	2
19	"	5
20	"	11
21	CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	4
22	"	3
23	"	1
24	"	2
25	"	2
26	"	646
27	"	257
28	"	64
29	"	53
30	"	66
31	"	33
32	"	26
33	"	12
34	"	24
35 à 44	CHCl ₃ -CH ₃ OH (90:10)	306
45 à 55	CHCl ₃ -CH ₃ OH (75:25)	265
56 à 60	CHCl ₃ -CH ₃ OH-éther (1:1:1)	78
Total....		5171 mg

Les fractions 21 à 33 (chr. n° 1) et 21 à 34 (chr. n° 2) éluées par le chloroforme renfermant 5 % de méthanol constituent le *mycoside* C₄.

Les premiers éluats (1 à 20) passant au chloroforme sont réunis et rechromatographiés dans les mêmes conditions (chr. 3). On obtient une nouvelle quantité de mycoside C_m, éluee par le solvant chloroforme-méthanol (95:5).

Chromatographie n° 3		
Fractions	Solvant	mg
1	CHCl ₃	5
2	"	-
3	"	-
4	"	188
5	"	461
6	"	77
7	"	88
8	"	73
9	"	79
10	"	114
11	"	212
12	"	151
13	"	188
14	"	50
15	"	32
16	"	21
17	"	17
18	"	12
19	CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	8
20	"	11
21	"	4
22	"	4
23	"	231
24	"	1248
25	"	431
26	"	265
27	"	67
28	"	35
29	"	27
30	"	21
31	"	17
32	"	8
33	"	15
34	"	11
35 à 44	CHCl ₃ -CH ₃ OH (90:10)	65
45 à 55	CHCl ₃ -CH ₃ OH (75:25)	21
56 à 58	CHCl ₃ -CH ₃ OH-éther (1:1:1)	13
Total...		4218 mg

On recueille 5,4 g de mycoside C_m pur, F. 198-200°, [α]₀ = - 31° (CHCl₃, c = 1,5).

L'analyse donne :

% C 64,32	H 8,87	N 4,70	(O)-CH ₃ 2,44	(CO)-CH ₃ 2,28
64,65	8,52		2,41	

calculé pour C₁₀₈H₁₈₅N₇O₂₈ :

% C 63,90	H 9,18	N 4,82	4(O)-CH ₃ 2,95	3(CO)-CH ₃ 2,15
-----------	--------	--------	---------------------------	----------------------------

Le poids moléculaire du mycoside C_m a été déterminé selon la méthode de Barger et Rast (76, 77) dont nous avons exposé le principe dans le chapitre II. Les résultats obtenus sont indiqués

dans le tableau 30. La concentration de la solution de mycoside C₂ est de 32,4 mg pour 1 ml de chloroforme.

Tableau 30

Concentration molaire de la solution de naphthalène (mole/l)	Sens du déplacement du ménisque dans les capillaires après 48 h.	P.M. du mycoside C ₂
0,04	-	> 815
0,02	-	>1630
0,018	-	>1810
0,016	+	>2040
0,014	+	>2330
0,012	+	>2716

Nous constatons que le sens du déplacement du ménisque dans les capillaires (croquis 2, chapitre II) est négatif pour une concentration molaire de la solution de naphthalène variant de 0,04 à 0,018 mole/l, il est positif quand cette solution contient de 0,016 à 0,012 mole/l.

Par conséquent, la concentration molaire de la solution de mycoside est supérieure à 0,018 mole/l, et inférieure à 0,016 ce qui correspond à un poids moléculaire voisin de 2000.

B - Mycoside C₂.

La fraction lipidique extraite de *M. avium* par le mélange alcool-éther (1:1), insoluble dans l'eau et dans l'éther est chromatographiée successivement sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt, puis sur colonne de trisilicate de magnésium (Siegfried-Zofingen).

1 - Purification du mycoside C₂ de *M. avium*, souche 802.

2,25 g de mycoside brut sont dissous dans 5 ml de chloroforme et chromatographiés sur colonne de 50 g d'acide silicique activé par chauffage à 110° pendant 24 heures et de 25 g de célite 545. Elution par fractions de 100 ml.

Chromatographie n° 4

Fractions	Solvant	mg
1 à 9	CHCl ₃	186
10 à 14	CHCl ₃ -CH ₃ OH (99:1)	74
15	CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	5
16	"	7
17	"	987
18	"	483
19	"	34
20	"	18
21	"	14
22	"	7
23	"	8
24	"	8
25	"	7
26	"	4
27 à 29	CHCl ₃ -CH ₃ OH (94:6)	13
30 à 41	CHCl ₃ -CH ₃ OH (90:10)	201
42 à 43	CHCl ₃ -CH ₃ OH (80:20)	32
Total...		2097 mg

Les fractions 17 et 26 de la chromatographie n° 4 sont dissoutes dans 5 ml de chloroforme et rechromatographiées sur 30 g de trisilicate de magnésium activé par chauffage à 110° pendant 4 heures et de 15 g de célite 545. Elution par fractions de 50 ml.

Chromatographie n° 5

<u>Fractions</u>	<u>Solvant</u>	<u>mg</u>
1	CHCl ₃	1
2	"	278
3	"	202
4	"	31
5	"	24
6	"	23
7	"	8
8	"	7
9	"	8
10	CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	8
11	"	420
12	"	145
13	"	24
14	"	10
15	"	4
16	"	1
17	"	4
18	"	3
19	"	-
20	CHCl ₃ -CH ₃ OH (90:10)	2
21	"	2
Total....		1205 mg

Les fractions 1 à 6 passent au chloroforme constituent la *fraction II_a*.

Les éluats 11 à 14 passant au chloroforme avec 5 % de méthanol constituent la *fraction II_b*.

Les fractions II_a et II_b sont rechromatographiées sur trisilicate de magnésium traité selon Smith et coll. (4) : le trisilicate est lavé successivement à l'eau, au méthanol puis à l'éther. Après séchage à l'air, pendant une nuit, il est activé 1 heure à 150° avant la chromatographie (chr. 6 et 7).

Chromatographie n° 6

<u>Fractions</u>	<u>Solvant</u>	<u>mg</u>
1 à 25	CHCl ₃	154
26	CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	1
27	"	1
28	"	21
29	"	175
30	"	127
31	"	48
32	"	13
33	"	2
34	"	6
35	"	1
36	"	1
37 à 40	CHCl ₃ -CH ₃ OH (90:10)	7
Total....		539 mg

Chromatographie n° 7

<u>Fractions</u>	<u>Solvant</u>	<u>mg</u>
1 à 14	CHCl ₃	88
15	CHCl ₃ -CH ₃ OH-(99:1)	1
16	"	1
17	"	1
18	"	2
19	"	10
20	"	38
21	"	25
22	"	14
23	"	19
24	"	15
25	CHCl ₃ -CH ₃ OH (98:2)	15
26	"	11
27	"	8
28	"	26
29	"	56
30	"	15
31	"	21
32	"	15
33	"	10
34	"	10
35	"	6
36	"	4
37	"	6
38	CHCl ₃ -CH ₃ OH (96:4)	6
39	"	5
40	"	4
41	"	18
42	"	7
43	"	11
44	"	8
45	CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	10
46	"	4
47	"	5
48	"	4
49	"	4
50	"	5
51	"	3
52 à 54	CHCl ₃ -CH ₃ OH (92:8)	3
55 à 58	CHCl ₃ -CH ₃ OH (90:10)	13
59 à 61	CHCl ₃ -CH ₃ OH (85:15)	9
62 à 65	CHCl ₃ -CH ₃ OH (80:20)	7
66 à 72	CHCl ₃ -CH ₃ OH (75:25)	6
Total....		552 mg

La chromatographie n° 6 donne une fraction principale, le *mycoside* C₂, élue par le solvant chloroforme-méthanol (95:5). Il représente 65 % de la fraction II_a ;

La chromatographie n° 7 donne deux fractions principales, C₃ élue par le solvant chloroforme-méthanol (99:1), représente 26 % de la fraction II_b, C₄ élue par le solvant chloroforme-méthanol (98:2) représente 27 % de la fraction II_b. Les points de fusion, pouvoirs rotatoires et analyses élémentaires de ces fractions sont indiqués dans le tableau 19 (chapitre IV).

2 - Purification du mycoside C₂ de *M. avium* souche "faisan".

4 mg de mycoside brut sont dissous dans 5 ml de chloroforme et chromatographiés sur une colonne de 100 g d'acide silicique activé par chauffage à 110° pendant 24 heures et de 50 g de célite 545. Elution par fractions de 100 ml.

Chromatographie n° 8

<u>Fractions</u>	<u>Solvant</u>	<u>mg</u>
1	CHCl ₃	3
2	"	19
3	"	77
4	"	215
5	"	170
6	"	137
7	"	111
8	"	85
9	"	54
10	"	37
11	CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	27
12	"	16
13	"	12
14	"	8
15	"	11
16	"	778
17	"	555
18	"	153
19	"	71
20	"	65
21	"	39
22	"	35
23	"	-
24	"	15
25	"	13
26 à 35	CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	382
36 à 44	CHCl ₃ -CH ₃ OH (85:15)	397
Total...		3566 mg

Les éluats 16 à 25 de la chromatographie n° 8 sont dissous dans 3 ml de chloroforme et rechromatographiés sur 60 g de trisilicate de magnésium activé par chauffage 3 heures à 120° et de 30 g de célite 545. Elution par fractions de 50 ml.

Chromatographie n° 9

<u>Fractions</u>	<u>Solvant</u>	<u>mg</u>
1 à 11	CHCl ₃	80
12	CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	3
13	"	3
14	"	1
15	"	235
16	"	155
17	"	36
18	"	21
19	"	7
20	"	10
21	CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	7
22 à 28	CHCl ₃ -CH ₃ OH (90:10)	60
29 à 32	CHCl ₃ -CH ₃ OH (75:25)	13
Total...		631 mg

Les fractions 12 à 20 de la chromatographie n° 9 sont rechromatographiées sur trisilicate de magnésium traité selon Smith et coll. (4). Elution par fraction de 25 ml.

Chromatographie n° 10

<u>Fractions</u>	<u>Solvant</u>	<u>mg</u>
1 à 20	CHCl ₃	43
21	CHCl ₃ -CH ₃ OH (98:2)	2
22	"	-
23	"	1
24	"	-
25	"	-
26	"	1
27	"	2
28	"	6
29	"	26
30	"	20
31	"	26
32	"	21
33	"	16
34	"	14
35	"	13
36	CHCl ₃ -CH ₃ OH (97:3)	10
37	"	9
38	"	9
39	"	4
40	"	12
41	"	12
42	CHCl ₃ -CH ₃ OH (95:5)	12
43	"	8
44	"	7
45	"	7
46	"	9
47	"	10
48	"	13
49	"	12
50	"	8
51	"	7
52	"	5
53	"	3
54 à 64	CHCl ₃ -CH ₃ OH (90:10)	40
Total...		393 mg

La chromatographie n° 10 donne une fraction F₁ éluée par le solvant chloroforme-méthanol (98:2) ; elle représente le mycoside C₂ de la souche "faisan".

Les éluats 39 à 43 et 44 à 53 représentent respectivement les fractions F₂ et F₃.

II - METHODES D'HYDROLYSE.

A - Hydrolyse alcaline.

Elle est effectuée sur 50 mg de mycoside en solution chloroformique par la potasse méthanolique 0,45 N à température ordinaire pendant une heure, ou par la potasse éthanolique 0,18 N pendant 17 heures.

B - Hydrolyses acides.

1 - Hydrolyse totale.

L'hydrolyse totale est effectuée pour rechercher les acides aminés présents dans les différents mycosides, peptides et glycopeptides.

1 à 10 mg de produit sont hydrolysés par 0,5 ml d'HCl 6 N en tube scellé à 110° pendant 24 ou 48 heures. Deux fractions sont recueillies, l'une lipidique éthersoluble, et l'autre hydrosoluble qui contient les acides aminés.

2 - Hydrolyse selon Mac Lennan (6).

Les sucres sont recherchés dans l'extract aqueux obtenu après hydrolyse chlorhydrique effectuée selon Mac Lennan et coll. (6), 5 à 20 mg de mycoside sont hydrolysés par 0,5 ml d'HCl N en tube scellé à 100° pendant 16 heures. Deux fractions sont recueillies, l'une soluble dans l'eau, l'autre soluble dans le chloroforme. La fraction chloroformique est hydrolysée deux fois dans les mêmes conditions. Les extraits aqueux sont réunis, séchés sous vide et chromatographiés dans différents solvants.

3 - Hydrolyses partielles.

50 à 100 mg de mycoside sont dissous dans 2 à 4 ml d'acide acétique glacial et hydrolysés à 37° par 2 à 4 ml d'acide chlorhydrique. La concentration de l'acide est 3 N, 6 N, 10 N ou 12 N et le temps d'hydrolyse est 16 heures ou 24 heures. L'éther extrait ensuite une partie liposoluble. Les phases aqueuses sont chromatographiées dans le solvant butanol-acide acétique-eau (65:10:25). Les peptides et les glycopeptides sont obtenus par chromatographie préparative dans le même solvant. Leur étude est effectuée par hydrolyse totale avec HCl 6 N à 110° pendant 24 heures et par hydrolyse ménagée avec HCl 12 N à 37° pendant 16 heures.

III - METHODES D'ANALYSE QUANTITATIVE DES ACIDES AMINES SUR COLONNE DE RESINE.

A - Méthode de Moore et Stein utilisant le Dowex 50 x 4 (78).

Cette méthode a été appliquée au dosage des acides aminés du mycoside C.

1 - Préparation de la résine et confection de la colonne.

La résine est lavée 2 fois à l'eau distillée, 3 fois à la soude N, 3 fois à l'eau distillée, puis tamponnée avec un tampon citrate de pH 5,1 ; 0,2 N. Elle est alors introduite dans la colonne. On fait passer une solution de soude 0,2 N contenant 0,5 % d'une solution de Brij 35 à 50 %, puis on tamponne à pH 3,1 ; 0,2 N.

Composition des différents tampons utilisés

pH	Acide citrique (g/l)	NaOH (g/l)	CH ₃ COONa 3H ₂ O (g/l)	CH ₃ COOH (g/l)	(HCl) (ml/l)	Brij. sol. 50 % (ml/l)
3,1; 0,2 N	21	8,3			11,55	5
5,1; 2 N	105	47	136	21,5		1

2 - Préparation de l'hydrolysat.

5 mg de mycoside sont hydrolysés par 0,2 ml de HCl 6 N à 110° pendant 24 heures. Après avoir extrait la partie lipidique à l'éther, la partie hydrosoluble est évaporée à sec. On reprend par 2 ml, on ajuste le pH à 4,75-4,8 avec NaOH 2 N puis on évapore à sec. On répète trois fois cette opération.

3 - Marche de la chromatographie.

L'hydrolysat repris par 2 ml de tampon citrate pH 3,1 0,2 N est chargé sur la colonne. L'éluat est recueilli par fraction de 1 ml.

<u>Fractions</u>	<u>Tampons</u>	<u>Température</u>
1 à 128	pH 3, 1; 0, 2 N	30°
128 à 197	"	50°
197 à 306	gradient pH 5, 1; 2 N pH 3, 1; 0, 2 N	"

4 - Dosages.

Les dosages sont effectués avec le réactif suivant :

Pour 1 ml de réactif :

- 0,75 ml de méthylcellosolve
- 20 mg de ninhydrine
- 3 mg d'hydrindantine
- 0,25 ml de tampon pH 5,5 ; 4 M.

Après addition dans chaque tube de 1 ml de réactif, on agite puis on laisse 15 minutes au bain-marie bouillant. Après refroidissement, on ajoute dans chaque tube 5 ml d'alcool à 50 %. La coloration est lue au spectrophotomètre à 570 m.μ. Les colorations sont traduites en micromoles d'acides aminés au moyen d'une courbe témoin établie pour la leucine. Les résultats du dosage des acides aminés du mycoside C_m sont indiqués dans le tableau 31.

Tableau 31

Résultats du dosage des acides aminés du mycoside C_m selon Moore et Stein. Valeurs exprimées en micromoles d'équivalents leucine.

	Poids de mycoside (mg.)	Durée de l'hydrolyse	Pic 1 <i>allo</i> -Thr	Pic 2 Ala	Pic 3 Phe
Essai n° 1	5,6	24 H.	3,3	3,5	1,25
Essai n° 2	7,2	48 H.	4	4	1,41

La figure 4, chapitre III, représente la courbe obtenue. Les fractions correspondant à un pic sont réunies. Leur homogénéité est vérifiée par chromatographie sur papier après dessalification sur colonne de résine Dowex 2 (124).

B - Méthode de Spackman utilisant l'Amberlite CG 120 (79).

Elle a été utilisée pour le dosage des acides aminés des mycosides C₂.

1 - Préparation de la résine et confection de la colonne.

La résine est mise en suspension dans l'eau. Elle est lavée à la soude 0,2 N puis avec le tampon pH 4,25; 0,2 N. Elle est alors introduite dans la colonne. On lave avec NaOH 0,2 N contenant 0,5 % d'une solution de Brij 35 à 50 %, puis on tamponne à pH 3,25 ; 0,2 N.

2 - Préparation de l'hydrolysate et marche de la chromatographie.

5 mg de mycoside sont hydrolysés par 0,4 ml de HCl 6 N à 110° pendant 45 heures. Après avoir extrait la partie lipidique à l'éther, la partie hydrosoluble est évaporée à sec ; les 3/5 de l'hydrolysate repris par 2,5 ml de tampon pH 3,25 sont chargés sur la colonne préalablement tamponnée au même pH. L'éluate est recueilli par fractions de 1 ml.

Fractions	Tampons	Température
1 à 259	0,2 N ; pH 3,25	50°
260 à 354	0,2 N ; pH 4,25	50°

Composition des différents tampons utilisés

pH	Normalité	Acide citrique (g/l)	NaOH (g/l)	(HCl) (ml/l)	Brij. Sol. à 50 % (ml/l)
3,25	0,2	21	8,25	10,65	5
4,25	0,2	21	8,25	4,70	5

3 - Dosages.

Les dosages sont effectués selon la méthode décrite précédemment. Les colorations lues au spectrophotomètres à 570 m. μ sont traduites en micromoles d'acides aminés au moyen d'une courbe témoin établie pour la leucine.

Les rapports molaires des acides aminés des mycosides C₂ de *M. avium* sont :

- Souche 802 : D-Phe : 0,90 ; D-*allo*-Thr : 2,06 ; D-Ala : 2,15.
- S. "faisan" : D-Phe : 0,90 ; D-*allo*-Thr : 2,05 ; D-Ala : 2,08.

Les figures 25 et 29, chapitre IV, représentent les courbes obtenues.

IV - METHODES D'ETUDE DES SUCRES.

A - Réaction de Dische et Shettles (91).

1 - Principe.

Les 6-désoxyhexoses donnent, avec le chlorhydrate de cystéine en présence d'acide sulfurique à chaud, une coloration jaune. Cette réaction est vraisemblablement due à la condensation de la cystéine par sa fonction thiol avec le méthyl-furfural, produit de dégradation des 6-désoxyhexoses sous l'action d'acide concentré.

2 - Mode opératoire :

A 1 ml d'une solution contenant 10 à 100 microgrammes de 6-désoxyhexose, on ajoute 4,5 ml de H₂SO₄ 30 N (H₂SO₄-H₂O, 6:1 v/v) en refroidissant dans la glace. On porte la solution au bain-marie à 100° et après refroidissement, on ajoute 0,1 ml d'une solution aqueuse à 3 % de chlorhydrate de cystéine. Il se développe une coloration jaune avec un maximum à 396 m μ . On effectue les lectures une heure après l'addition de chlorhydrate de cystéine. Les courbes d'absorption (figure 5, chapitre III et figures 22, 28, chapitre IV) sont identiques pour les 6-désoxyhexoses isolés des mycosides et pour le rhamnose témoin.

B - Dosage colorimétrique des sucres selon la méthode de Dische et Shettles (91).

1 - Dosage des sucres totaux.

Nous avons dosé les sucres totaux à partir de 5 mg de mycoside après hydrolyse chlorhydrique selon Mac Lennan (6). Le dosage est effectué selon la méthode colorimétrique de Dische et Shettles décrite précédemment. Le rhamnose est utilisé comme étalon. Pour chaque concentration de rhamnose et pour l'échantillon inconnu, on mesure par planimétrie l'aire comprise entre l'axe des abscisses et la courbe d'absorption de 350 à 435 m μ . Les résultats sont représentés par les courbes de la figure 31.

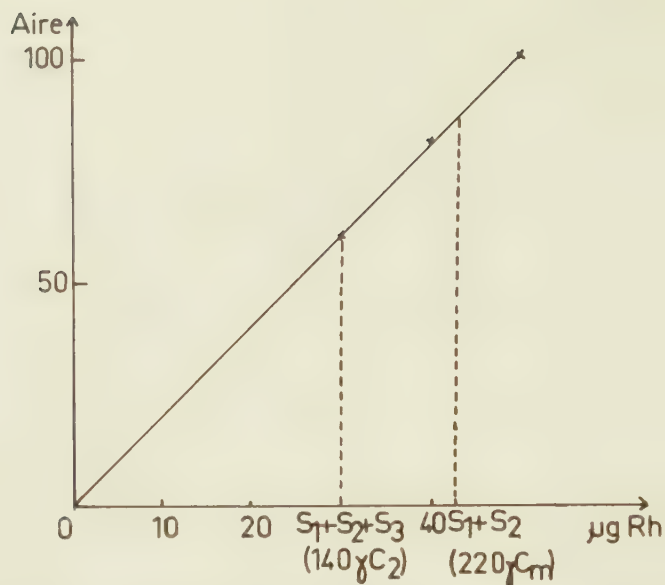


Figure 31 - Courbe d'absorption du rhamnose à 396 m μ en milieu cystéine-acide sulfurique (Dische et Shettles).

2 - Dosage de chacun des sucres isolés des mycosides.

5 mg de mycoside sont hydrolysés selon Mac Lennan (6). Les sucres présents dans les extraits aqueux sont isolés par chromatographie préparative dans le solvant : acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3). La réaction de Dische et Shettles est effectuée sur les différents éluats. Pour chacun des sucres on utilise comme étalon, le sucre correspondant isolé du mycoside. Pour chaque concentration du témoin et pour l'échantillon inconnu, on mesure au planimètre l'aire comprise entre l'axe des abscisses et la courbe d'absorption de 350 à 435 m μ . Les courbes sont représentées sur la figure 32.

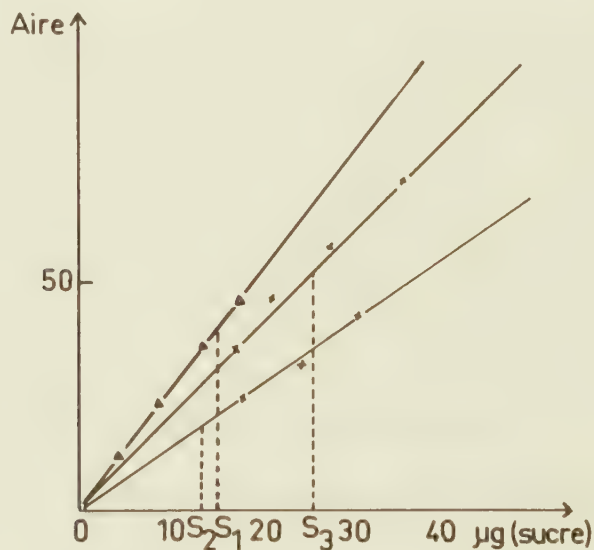


Figure 32 - Courbes d'absorption à 396 m μ du 6-désoxytalose, 3-O-méthyl-6-désoxytalose et 3,4-di-O-méthylrhamnose en milieu cystéine-acide sulfurique (Dische et Shettles).

C - Déméthylation.

La déméthylation du 3,4-di-O-méthyl-L-rhamnose est effectuée par BCl_3 (92). On introduit dans un tube de verre étroit 6,6 mg de sucre et on refroidit à -70° , puis on ajoute 0,5 ml de BCl_3 . Après agitation, le tube est scellé et on laisse en contact pendant une heure et demie à -70° . Le tube est ensuite ouvert, on laisse évaporer BCl_3 ; on ajoute 1 ml de méthanol aqueux à 50 %. On concentre sous vide et on reprend par 0,1 ml d'eau. Cette solution est utilisée pour la recherche des oses par chromatographie sur papier.

V - REACTIONS DIVERSES.

A - Oxydation par l'hypoiodite (109).

20 à 30 mg de mycoside sont dissous dans 2 ml de dioxane et additionnés à 3 ml d'une solution aqueuse 0,1 N d'iode et 1 ml de solution de carbonate de sodium à 5 %. On effectue parallèlement un essai témoin avec les réactifs seuls. Chaque essai est abandonné une heure à 40° . On ajoute ensuite 2,5 ml d'acide sulfurique N et on titre avec l'hypo-sulfite 0,01 N.

B - Action de l'hydroxylamine (110).

Le réactif à l'hydroxylamine est un mélange de deux solutions A et B.

- Solution A : 1 g de chlorhydrate d'hydroxylamine dans 1,7 ml d'eau et 32,3 ml d'éthanol.

- Solution B : 1 g de soude dissous dans 1,7 ml d'eau et 32,3 ml d'éthanol.

On ajoute 2 ml de réactif à une solution de 20 à 30 mg de mycoside dans 2 ml de chloroforme. On laisse 30 minutes à température ordinaire en agitant. On évapore ensuite la solution et le résidu est extrait plusieurs fois par l'eau et par le chloroforme. Les extraits aqueux sont passés sur Amberlite MB₃, puis chromatographiés dans le solvant acétate d'éthyle-acide acétique-eau (3:1:3).

C - Traitement par NaBH_4 en milieu alcalin (111).

60 mg de mycoside sont dissous dans 5 ml de chloroforme. On ajoute 420 mg de NaBH_4 dissous dans 25 ml d'éthanol aqueux à 80 %. Quand le dégagement d'hydrogène a cessé, on chauffe la solution sous reflux pendant 30 minutes, puis on ajoute 341 mg de NaBH_4 dans l'éthanol aqueux et on porte à l'ébullition pendant 45 minutes. Après évaporation des solvants, on acidifie par H_2SO_4 N et on extrait par l'eau et le chloroforme. La partie hydrosoluble est passée sur Amberlite MB₃, extraite à l'éther, passée à nouveau sur Amberlite MB₃ et évaporée à sec. Cette phase aqueuse est utilisée pour mettre en évidence le 6-désoxy-L-talitol par chromatographie sur papier.

D - Méthylation selon la Méthode de Kuhn (112).

100 mg de mycoside sont dissous dans 10 ml de diméthylformamide. On ajoute 4 ml d'iodure de méthyle, 3 g d'oxyde d'argent fraîchement préparé que l'on introduit en deux fois et on laisse à 23° sous agitation pendant 48 heures. On ajoute alors 2,5 ml d'iodure de méthyle, 2,5 g d'oxyde d'argent, 7,5 ml de diméthylformamide et on agite de nouveau pendant 48 heures. Après une troisième addition d'iodure de méthyle et d'oxyde d'argent, la méthylation est terminée.

On filtre et on lave le précipité par le diméthylformamide et le chloroforme. Le filtrat est additionné de 150 ml d'eau contenant 4 g de KCN. On concentre jusqu'à disparition du diméthylformamide puis on extrait à l'eau et au chloroforme. Les extraits chloroformiques renferment le produit méthylé. Celui-ci est chromatographié sur trisilicate de magnésium activé une nuit à 100° , en mélange avec la célite 545. Le mycoside méthylé est élué par le chloroforme contenant 5 % de méthanol.

E - Désacétylation des mycosides.

50 mg de produit sont dissous dans 2 ml de méthanol anhydre. On ajoute 10 ml de méthano-
late de sodium (1 g de sodium dans 10 ml de méthanol anhydre) et on laisse 30 minutes à tempé-
rature ordinaire. Le méthanol est évaporé et après acidification par HCl dilué, on reprend par
l'eau et le chloroforme. Les extraits chloroformiques contiennent le mycoside désacétylé.

F - Dinitrophénylation des peptides selon la méthode de Sanger (115).

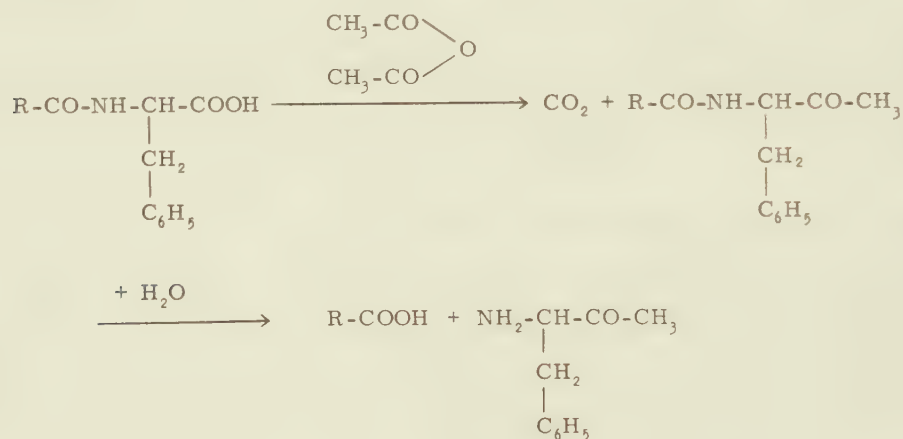
L'acide aminé N-terminal des différents peptides obtenus après hydrolyse partielle des my-
cosides est déterminé par la méthode de Sanger ; 500 µg de peptide sont dissous dans 0,1 ml
d'eau. On ajoute 10 µl de 2,4-dinitrofluorobenzène dans 0,2 ml d'acétone. Le pH est ajusté à 8
par addition d'une solution diluée de triméthylamine. On agite pendant trois heures à température
ordinaire. L'excès de DNFB est extrait trois fois à l'éther. Après évaporation à sec de la solution
aqueuse qui contient le DNP peptide, le résidu est hydrolysé par HCl 6 N à 110° pendant 5 heures. Le
DNP amino-acide éthérosoluble est identifié par chromatographie sur papier dans différents sol-
vants.

G - Réaction de Dakin-West appliquée aux peptides et glycopeptides pour la détermination de l'acide aminé C-terminal (120).

1 - Méthode de Turner et Schmerzler (122).

Nous l'avons utilisée pour mettre en évidence la cétone aminée dérivant de la phénylalanine.

La réaction se fait en milieu anhydride acétique-pyridine à 150°.



phényl 4-amino 3-butanone 2

Le mode opératoire est le suivant : à 5 mg de produit sont additionnés 0,75 ml d'anhydride
acétique et 0,5 ml de pyridine. Le mélange est chauffé en tube scellé à 150° pendant deux heures,
puis on extrait à l'eau et à l'éther. L'extrait étheré est hydrolysé par HCl 6 N pendant une nuit
à 110°. L'hydrolysat est utilisé pour la recherche de la cétone aminée par chromatographie sur
papier.

2 - Méthode de Shepherd (121).

Elle a été appliquée en particulier pour la détermination de l'acide aminé C-terminal du
dipeptide D-*allo*-Thr-D-Ala.

Le dipeptide est mis en contact avec le mélange anhydride acétique-pyridine (3:2) pendant
6 heures, la température étant maintenue à 80°. On reprend ensuite plusieurs fois à l'eau puis on
hydrolyse par HCl 6 N à 110° pendant 24 heures. L'hydrolysat est passé sur Dowex 2 puis chro-
matographié sur papier pour l'identification des substances aminées.

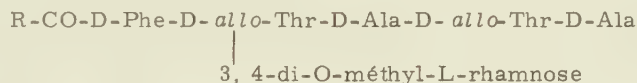
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

L'étude du mycoside C_m , peptidoglycolipide de *Mycobacterium marianum*, conduit à la formule développée 6. Nous avons admis la présence d'un hydroxyacide diéthylénique $C_{50}H_{96}O_3 \pm 3CH_2$ lié par son carboxyle avec le groupement aminé d'une molécule de D-phénylalanine, elle-même fait partie d'un heptapeptide de structure :



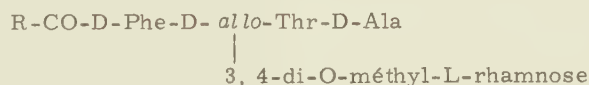
Le carboxyle C-terminal de la D-alanine est estérifié par l'hydroxyle 1 d'une molécule de 6-désoxy-L-talose, tandis que deux molécules de D-*allo*-thréonine ont leurs (OH) glycosidés par une molécule de 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose. Deux groupements O-acétyles sont liés au 6-désoxy-L-talose, un troisième est fixé sur l'une des 2 molécules de 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose.

L'étude de mycoside C_2 extrait de *Mycobacterium avium* a montré qu'il s'agissait d'un mélange de deux peptidoglycolipides homologues C_{2a} (formule 9) et C_{2b} (formule 10). Ils ont en commun la séquence suivante :

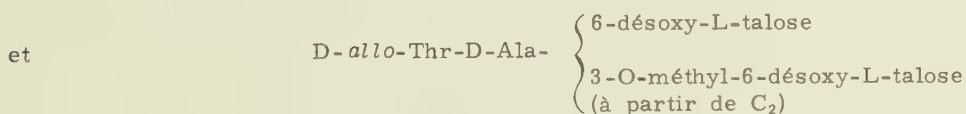
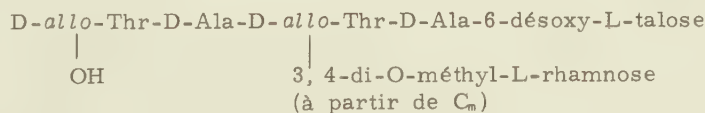


La molécule C-terminale de D-alanine estérifie la fonction pseudo-aldéhydique du 6-désoxy-L-talose dans le mycoside C_{2a} et celle du 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose dans le mycoside C_{2b} . Un groupement acétyle est fixé sur le 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose et deux groupements acétyles sur le 3-O-méthyl-6-désoxy-L-talose. La partie lipidique est liée par une fonction amide au groupement aminé de la D-phénylalanine.

Les formules 6, 9 et 10 ont été établies d'après l'analyse des produits obtenus après hydrolyses partielles. On remarque dans la chaîne peptidique de C_m et de C_2 la présence d'une molécule de D-*allo*-thréonine dont l'hydroxyle est libre ce qui constitue un point sensible aux agents d'hydrolyse. D'où l'obtention d'une part du lipide azoté :



et d'autre part des glycopeptides :



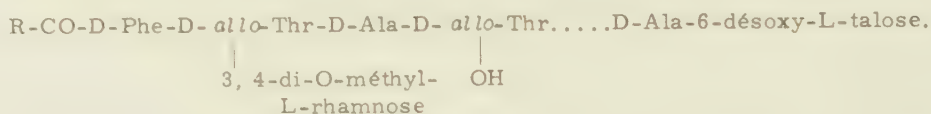
Nous avons également isolé et identifié le dipeptide :

D-*allo*-Thr-D-Ala

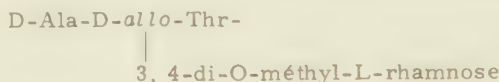
et le tripeptide :

D-Phe-D-*allo*-Thr-D-Ala

Si l'on compare les mycosides C₁ et C₂, on constate une grande analogie de structure. Les deux composés renferment la séquence :



C₂ peut, en outre, fixer sur l'alanine C-terminale le dérivé 3-O-méthylé du 6-désoxy-L-talose. C₁ possède une séquence heptapeptidique avec le groupement supplémentaire :



intercalé entre la deuxième molécule de D-*allo*-thréonine et la D-alanine C-terminale.

Quelques points sont à souligner en ce qui concerne la nature des constituants.

- Tous les acides aminés ont la configuration D, inhabituelle pour les acides aminés des règnes animal et végétal mais assez fréquente dans les peptides bactériens. Il faut noter d'autre part la présence de D-*allo*-thréonine ; l'une des molécules ayant l'hydroxyle libre. Dans tous les mycosides, la D-phénylalanine est liée à la partie lipidique par une liaison amide.

- Les sucres fixés sur la chaîne peptidique sont des 6-désoxy-L-hexoses O-méthylés ou non. Des groupements acétyles estérifient certaines fonctions alcools de ces 6-désoxyhexoses.

- Le carboxyle C-terminal de la D-alanine est lié par une fonction ester à l'hydroxyle pseudoaldéhydrique du 6-désoxy-L-talose ou de son dérivé 3-O-méthylé. Il faut noter qu'une fonction ester de l'alanine a déjà été rencontrée dans les acides teichoïques où cet acide aminé estérifie un hydroxyle du ribitol ou du glycérol (125).

- Les dérivés méthylés du rhamnose sont liés par une liaison glycosidique "vraie" ; notons en particulier qu'une molécule de 3, 4-di-O-méthyl-L-rhamnose est liée à l'hydroxyle de l'*allo*-thréonine voisine de la partie lipidique. Récemment, de telles liaisons glycosidiques entre sucres et hydroxyaminoacides ont été signalées dans les glycoprotéines complexes du règne animal, par Harbon et coll. (126) ; Anderson et coll. (127, 128), Tanaka et Pigman (129) et Gottschalk et coll. (130).

Lorsque ces auteurs soumettent une mucoprotéine de la glande sous-maxillaire de brebis, ou un chondroïtine sulfate à une hydrolyse alcaline, ils observent la libération d'oses ou d'osides avec parallèlement une diminution du taux des hydroxyaminoacides (127). Dans cette réaction, les hydroxyaminoacides O-substitués sont transformés en acides α - β insaturés (126, 128), la sérine donnant la déhydroalanine et la thréonine l'acide α -aminocrotonique.

L'étude comparative des conditions d'hydrolyse alcaline des mycosides C et des glycoprotéines animales montre que les liaisons glycosidiques entre ose et hydroxyaminoacide sont scindées dans des conditions assez énergiques contrairement aux liaisons esters entre sucre et amino-acide qui sont rompues par saponification douce à température ordinaire pendant des temps plus courts et avec une solution de potasse de faible normalité.

Il est curieux de constater que dans les glycoprotéines complexes du règne animal les hydroxyles de la thréonine ou de la sérine sont glycosidés par des di-ou polyosides, tandis que chez les bactéries, ce sont plutôt des fonctions esters qui lient les sucres aux acides aminés.

Dans les acides teichoïques, polymères présents dans les parois cellulaires des bactéries gram-positif, la D-alanine estérifie un groupement -OH appartenant au ribitol. Dans les mycosides C ce sont des 6-désoxyhexoses, 6-désoxy-L-talose ou son dérivé 3-O-méthylé, qui estérifient le groupement carboxylique de la D-alanine C-terminale.

D'autre part, la structure des mycosides C conduit à penser que ces composés sont à la surface des cellules bactériennes. Notons en particulier, la configuration D des acides aminés, identique à celle des constituants pariétaux des Actinomycétales, la présence de groupements O-acétyles

et O-alanyles que l'on retrouve dans les parois cellulaires bactériennes, la richesse en groupements lipophiles puisque trois moyens sont utilisés pour rendre les sucres lipophiles, réduction en CH_3 du CH_2OH en 6, O-méthylation et O-acétylation. On pourrait donc supposer que les mycosides jouent un rôle "d'agent de liaison" au voisinage de la paroi cellulaire.

Il est d'ailleurs très probable qu'il existe une similitude de structure entre les mycosides et les constituants pariétaux bactériens.

En effet l'isolement par Mac Lennan du 6-désoxy-L-talose dans la paroi cellulaire d'une souche d'*Actinomyces bovis* (107) est en faveur de cette hypothèse.

Une étude des constituants pariétaux des mycobactéries permettra peut-être de préciser les relations structurales et biochimiques entre ces différents groupes de composés.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] H. M. RANDALL, D. W. SMITH - J. Optic. Soc. Am., 1953, 43, 1086.
- [2] D. W. SMITH, W. K. HARREL et H. M. RANDALL - Am. Rev. Tuberc. Pulmonary Diseases, 1954, 69, 505.
- [3] D. W. SMITH, H. M. RANDALL, M. GASTAMBIDE-ODIER et A. L. KOEVOET - Ann. N. Y. Acad. Sci., 1957, 69, 145.
- [4] D. W. SMITH, H. M. RANDALL, A. P. MAC LENNAN, R. K. PUTNEY et S. V. RAO - J. Bactériol. 1960, 79, 217.
- [5] H. NOLL - J. Biol. Chem. 1957, 149, 224.
- [6] A. P. MAC LENNAN, D. W. SMITH et H. M. RANDALL - Biochem. J. 1960, 74, 3P.
- [7] D. W. SMITH, H. M. RANDALL, A. P. MAC LENNAN et E. LEDERER - Nature, 1960, 186, 887.
- [8] E. H. RUNYON - Medical Clinics of North America, 1959, 43, 273.
- [9] E. H. RUNYON - Am. Rev. Tuberc. 1955, 72, 866.
- [10] A. P. MAC LENNAN, D. W. SMITH et H. M. RANDALL - Biochem. J., 1961, 80, 309.
- [11] M. CHAPUT, G. MICHEL et E. LEDERER - Experientia, 1961, 17, 107.
- [12] M. CHAPUT, G. MICHEL et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 310.
- [13] M. CHAPUT, G. MICHEL et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta, 1963, 78, 329.
- [14] E. LEDERER - Advances in Carbohydrate Chem. 1961, 16, 207.
- [15] H. BLOCH - J. Exp. Med., 1950, 91, 197.
- [16] H. BLOCH - Am. Rev. Tuberc., 1950, 61, 270.
- [17] H. BLOCH, E. SORKIN et H. ERLÉNMEYER - Am. Rev. Tuberc. 1953, 67, 629.
- [18] E. SORKIN, H. ERLÉNMEYER et H. BLOCH - Nature, 1952, 170, 124.
- [19] J. ASSELINEAU, H. BLOCH et E. LEDERER - Am. Rev. Tuberc. 1953, 67, 853.
- [20] H. NOLL et H. BLOCH - Am. Rev. Tuberc. 1953, 67, 823.
- [21] J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta, 1955, 17, 161.
- [22] H. NOLL, H. BLOCH, J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta, 1956, 20, 299.
- [23] E. LEDERER - Festschr. Arthur Stoll, 1957, 384.
- [24] S. NOJIMA - J. Biochem. (Japan), 1959, 46, 499.
- [25] H. DEMARTEAU-GINSBURG - Thèse Doctorat, Paris, 1958.
- [26] G. MICHEL - Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, 41, 1649.
- [27] I. AZUMA et Y. YAMAMURA - J. Biochem., 1962, 52, 82.
- [28] I. AZUMA et Y. YAMAMURA - J. Biochem., 1962, 52, 92.
- [29] T. IONEDA, M. LENZ et J. PUDLES - Biochem. Biophys. Res. Comm. 1963, 13, 110.
- [30] E. VILKAS et A. ROJAS - Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 689.

- [31] R.J. ANDERSON, R.E. REEVES et F.H. STODOLA - J. Biol. Chem. 1937, *121*, 649.
- [32] J. ASSELINEAU - Thèse Doctorat, Paris, 1950.
- [33] R.J. ANDERSON, R.L. PECK et M.M. CREIGHTON - J. Biol. Chem. 1940, *133*, 675.
- [34] W.B. GEIGER et R.J. ANDERSON - J. Biol. Chem. 1939, *131*, 539.
- [35] N. HAWORTH, P.W. KENT et M. STACEY - J. Chem. Soc. 1948, 1211.
- [36] I. AZUMA et Y. YAMAMURA - J. Biochem., 1962, *52*, 200.
- [37] I. AZUMA et Y. YAMAMURA - J. Biochem., 1963, *53*, 275.
- [38] J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Progr. Chim. Org. Natur., 1953, *10*, 171.
- [39] J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Experimental tuberculosis, A Ciba Foundation Symposium, London, 1955, p. 14.
- [40] J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. Biol., 1949, *31*, 492.
- [41] M. BARBIER - Thèse de Sciences, 1954.
- [42] J. ASSELINEAU, H. BUC, P. JOLLES et E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, *40*, 1953.
- [43] M. IKAWA, E. SNELL et E. LEDERER - Nature, 1960, *188*, 558.
- [44] P. JOLLES, H. NGUYEN-TRUNG-LUONG-CROS et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta, 1960, *43*, 559.
- [45] E. LEDERER - Pure and Applied Chem., 1963, *7*, 263.
- [46] P. JOLLES, D. SAMOUR et E. LEDERER - Arch. Biochem. Biophys. Suppl. 1, 1962, 283.
- [47] P. JOLLES, D. SAMOUR et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta, 1963, *78*, 342.
- [48] C.S. CUMMINS et H. HARRIS - J. Gen. Microbiol., 1958, *18*, 173.
- [49] J. KARA et B. KEIL - Coll. Czech. comm., 1958, *23*, 1392.
- [50] J. FOLDES - Naturwiss., 1959, *46*, 432.
- [51] D. SAMOUR - Thèse Doctorat, 3^e cycle, Paris, 1963.
- [52] H. DEMARTEAU-GINSBURG et E. LEDERER - Biochim. Biophys. Acta, 1963, *70*, 442.
- [53] G.G. MAHER - Advances in Carbohydrate Chem., 1955, *10*, 257.
- [54] J. ASSELINEAU et E. LEDERER - in "Lipide Metabolism", K. Bloch, ed., John Wiley and Sons, Inc., New-York, 1960, p. 337.
- [55] H. BLOCH et H. NOLL - Brit. J. Exp. Patho. 1955, *8*, 36.
- [56] M. KATO - Chem. Abst., 1958, *52*, 18779.
- [57] M. KATO, K. MIKI, J. MATSUNAGA et Y. YAMAMURA - Am. Rev. Tuberc. Pulmonary, Diseases, 1959, *77*, 482.
- [58] M. KATO, M. KUSUNOSE, K. MIKI, K. MATSUNAGA et Y. YAMAMURA - Am. Rev. Resp. Diseases, 1959, *80*, 240.
- [59] S. RAFFEL, J. ASSELINEAU et E. LEDERER - A Ciba Foundation Symposium on experimental tuberculosis, London, 1955, p. 174, J.E.A. Churchill.
- [60] R.G. WHITE, L. BERNSTOCK, R.G.S. JOHNS et E. LEDERER - Immunology, 1958, *1*, 54.
- [61] J. FREUND - Adv. Tuberc. Research, Karger, Bâle, New-York, 1956, *7*, 130.
- [62] J. FREUND et K. MEDERMOTT - Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1942, *49*, 548.
- [63] R.G. WHITE, P. JOLLES, D. SAMOUR et E. LEDERER - Immunology, 1964, *7*, 158.
- [64] S. RAFFEL - Experientia, 1950, *6*, 410.
- [65] S. RAFFEL, E. LEDERER et J. ASSELINEAU - Feder. Proc. 1954, *13*, 509.
- [66] S. RAFFEL - Progress in Allergy, 1954, *4*, 173.
- [67] A. DELAUNAY, J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Compt. Rend. Soc. Biol. 1951, *145*, 650.

- [68] D.W. SMITH, H. M. RANDALL, S.V. RAO et G.B. FREGNAN - J. Bactériol., 1961, 82, 517.
- [69] O. NERACHER et T. REICHSTEIN - Helv. Chim. Acta, 1936, 19, 1382.
- [70] J.A. CIFONELLI et F. SMITH - Anal. Chem., 1954, 26, 1132.
- [71] J.G. KIRCHNER, J.M. MILLER et G. KELLER - Anal. Chem. 1951, 23, 420.
- [72] R.H. REITSEMA - Anal. Chem. 1954, 26, 960.
- [73] R.H. REITSEMA - J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Edit, 1954, 43, 414.
- [74] E. STAHL - Chemiker Ztg., 1958, 82, 323.
- [75] E. STAHL - Angew. Chem., 1961, 73, 646.
- [76] G. BARGER - Ber., 1904, 37, 1754.
- [77] K. RAST - Ber., 1921, 54, 1979.
- [78] S. MOORE et W.H. STEIN - J. Biol. Chem. 1954, 211, 893.
- [79] D.H. SPACKMAN, W.H. STEIN et S. MOORE - Anal. Chem. 1958, 30, 1190.
- [80] R.J. ANDERSON - Fortschr. Chem. Org. Naturst., 1939, 3, 145.
- [81] A. AEBI, J. ASSELINEAU et E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. Biol., 1953, 35, 661.
- [82] G. MICHEL - Thèse Doctorat, Paris, 1958.
- [83] M. GUINAND, G. MICHEL et E. LEDERER - Compt. Rend. 1958, 246, 848.
- [84] C.H. LEA et D.W. RHODES - Biochem. J., 1953, 54, 467.
- [85] J. ASSELINEAU - Les Lipides Bactériens, Hermann et Co, Paris. 1962, p. 184.
- [86] H. DEMARTEAU-GINSBURG et A.M. MIQUEL - Bull. Soc. Chim. Biol. 1962, 44, 679.
- [87] E.F. MAC FARREN - Anal. Chem. 1951, 23, 168.
- [88] J. EUW et T. REICHSTEIN - Helv. Chim. Acta, 1948, 31, 883.
- [89] R. PAUL et S. TCHELITCHEFF - Bull. Soc. Chim. - France, 1957, 443.
- [90] C. FOUQUEY, J. POLONSKY et E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 315.
- [91] Z. DISCHE et L.B. SHETTLES - J. Biol. Chem. 1948, 175, 595.
- [92] S. ALLEN, T.G. BONNER, E.J. BOURNE et N.M. SAVILLE - Chem. and Ind. 1958, 630.
- [93] J. SCHMUTZ - Helv. Chim. Acta, 1948, 31, 1719.
- [94] R.S. TIPSON, C.C. CHRISTMANN et P.A. LEVENE - J. Biol. Chem. 1939, 128, 609.
- [95] L. CROMBIE - J. Chem. Soc. 1955, 999.
- [96] G. MICHEL, C. BORDET et E. LEDERER - Compt. Rend., 1960, 250, 3518.
- [97] J.C. SHEEHAN, H.G. ZACHAU et W.B. LAWSON - J. Am. Chem. Soc. 1957, 79, 3933.
- [98] R. CONSDEN, A.H. GORDON, A.J.P. MARTIN, R.L.N. SYNGE - Biochem. J., 1947, 41, 596.
- [99] D. WRINCH - Nature, 1957, 179, 536.
- [100] H. BROCKMANN et G. SCHMIDT-KASTNER - Ber. 1955, 88, 57.
- [101] M. GUINAND, G. MICHEL et E. LEDERER - Compt. Rend., 1963, 256, 1621.
- [102] J. SCHMUTZ et T. REICHSTEIN - Helv. Chim. Acta, 1951, 34, 1264.
- [103] C.H. TAMM et T. REICHSTEIN - Helv. Chim. Acta, 1951, 34, 1224.
- [104] A. HUNGER et T. REICHSTEIN - Helv. Chim. Acta, 1952, 35, 1073.
- [105] H. MUHR, A. HUNGER et T. REICHSTEIN - Helv. Chim. Acta, 1954, 37, 403.
- [106] A.P. MAC LENNAN - Biochem. J., 1962, 82, 394.
- [107] A.P. MAC LENNAN - Biochim. Biophys. Acta, 1961, 48, 600.
- [108] A. MARKOWITZ - J. Biol. Chem. 1962, 237, 1767.

- [109] M. MAC LEOD et R. ROBINSON - Biochem. J., 1929, 23, 517.
- [110] M.M. RAPPORT et N. ALONZO - J. Biol. Chem. 1955, 217, 183.
- [111] J. POLONSKY, E. SACH et E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. 1959, 880.
- [112] R. KUHN, H. TRISCHMANN et I. LOW - Angew. Chem. 1955, 67, 32.
- [113] D.H. LEABACK - J. Chem. Soc. 1960, 3166.
- [114] E.O.P. THOMPSON, A.R. THOMPSON - Progrès dans la chimie des Substances Naturelles, 1955, 12, 270.
- [115] F. SANGER - Biochem. J., 1945, 39, 511.
- [116] S. BLACKBURN et A.G. LOWTHER - Biochem. J. 1951, 48, 126.
- [117] W.A. LANDMANN, M.P. DRAKE et W.P. WHITE - J. Am. Chem. Soc. 1953, 75, 4370.
- [118] E.F. MELLON, H.H. KORN et S.R. HOOVER - J. Am. Chem. Soc. 1953, 75, 1675.
- [119] K.N. SHAW et S.W. FOX - J. Am. Chem. Soc. 1953, 75, 3421.
- [120] H.D. DAKIN et R. WEST - J. Biol. Chem. 1928, 78, 745.
- [121] R.G. SHEPHERD, S.D. WILLSON, K.S. HOWARD, P.H. BELL, D.S. DAVIES, S.B. DAVIS, E.A. EIGNER et N.E. SHAKESPEARE - J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 5067.
- [122] R.A. TURNER et G. SCHMERZLER - J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 949.
- [123] P. JOLLES, F. BIGLER, T. GENDRE et E. LEDERER - Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 177.
- [124] J. JOLLES-THAUREAUX, P. JOLLES et C. FROMAGEOT - Biochim. Biophys. Acta, 1958, 27, 298.
- [125] J.J. ARMSTRONG, J. BADDILEY, J.G. BUCHANAN, A.L. DAVISON, M.V. KELEMEN et F.C. NEUHAUS - Nature, 1959, 184, 247.
- [126] S. HARBON, G. HERMANN, B. ROSSIGNOL, P. JOLLES et H. CLAUSER - Biochim. Biophys. Acta, 1964, 17, 57.
- [127] B. ANDERSON, P. HOFFMAN et K. MEYER - Biochim. Biophys. Acta, 1963, 74, 309.
- [128] B. ANDERSON, N. SENO, P. SAMPSON, J.G. RILLEY, P. HOFFMAN et K. MEYER - J. Biol. Chem. 1964, 239, PC 2716.
- [129] K. TANAKA, M. BERTOLINI et W. PIGMAN - Biochem. Biophys. Res. Comm. 1964, 16, 404.
- [130] V.P. BHAVANANDAN, E. BUDDECKE, R. CARUBELLI et A. GOTTSCHALK - Biochem. Biophys. Res. Comm., 1964, 16, 353.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION.....	5
CHAPITRE I - LES GLYCOLIPIDES DES MYCOBACTERIES.....	6
I - Structure des glycolipides des mycobactéries.....	6
A - Glycolipides "vrais".....	6
1 - Cord factor.....	6
2 - Glycolipides isolés des lipides liés.....	7
B - Peptidoglycolipides : Cires D.....	7
C - Mycosides.....	9
1 - Mycoside A.....	9
2 - Mycoside B.....	9
II - Propriétés biologiques des glycolipides des mycobactéries.....	10
A - Activité biologique du cord factor.....	10
B - Cires D.....	11
C - Mycosides A et B.....	11
CHAPITRE II - TECHNIQUES UTILISEES.....	12
I - Chromatographie.....	12
A - Chromatographie sur colonne.....	12
B - Chromatographie sur papier.....	12
C - Chromatographie sur couches minces.....	13
II - Techniques analytiques.....	13
A - Analyse élémentaire.....	13
B - Point de fusion.....	13

	Pages
C - Déterminations spectrophotométriques.....	13
D - Pouvoirs rotatoires.....	13
III - Techniques diverses.....	13
A - Détermination du P.M. selon la méthode de Berger et Rast.....	13
B - Dosage des acides aminés selon Moore et Stein.....	14
C - Dessalification des solutions aqueuses d'acides aminés, peptides et sucres	15
IV - Techniques d'extraction des bacilles.....	15
CHAPITRE III - LE MYCOSIDE C _m	16
I - Isolement et purification du mycoside C _m	16
II - Composition et nature des constituants.....	18
A - Fraction aminée.....	18
B - Fraction glucidique.....	20
1 - Nature de S ₁	23
2 - Nature de S ₂	25
3 - Dosage des sucres.....	27
C - Fraction lipidique.....	27
D - Conclusions.....	29
III - Structure du mycoside C _m	29
A - Etude de la partie osidique.....	29
1 - Position des sucres.....	29
2 - Position des groupements acétyles.....	30
a) méthylation du mycoside C _m	30
b) méthylation du mycoside C _m traité préalablement par NaBH ₄	31
c) méthylation du mycoside C _m désacétylé.....	31
d) discussion des résultats de méthylation.....	31
B - Etude de la partie peptidique.....	32
1 - Hydrolyse partielle n° 1.....	32
a) partie hydrosoluble.....	32
b) partie lipidique.....	33
2 - Hydrolyse partielle n° 2.....	34
IV - Formule C _m	36

	Pages
CHAPITRE IV - LE MYCOSIDE C ₂	37
I - Isolement et purification du mycoside C ₂	37
II - Etude des constituants glucidiques.....	40
A - Nature des sucres.....	40
B - Dosage des sucres.....	41
C - Mode de liaison des sucres.....	41
III - Etude des constituants aminés.....	43
IV - Structure de la partie glycopeptidique du mycoside C ₂	44
A - Hydrolyse partielle n° 1.....	44
1 - Partie hydrosoluble.....	44
2 - Partie éthérosoluble.....	45
B - Hydrolyse partielle n° 2.....	46
C - Hydrolyse partielle n° 3.....	48
1 - Partie hydrosoluble.....	48
2 - Partie éthérosoluble.....	50
V - Position des groupements acétyles.....	50
VI - Partie lipidique.....	51
VII - Formule du mycoside C ₂	51
VIII - Etude du mycoside C ₂ de <i>M. avium</i> , souche "faisan".....	52
A - Etude des constituants glucidiques.....	52
1 - Nature et dosage des sucres.....	52
2 - Mode de liaison des sucres.....	53
B - Etude des constituants aminés.....	53
C - Structure de la partie glycopeptidique.....	53
CHAPITRE V - DESCRIPTION DES EXPERIENCES.....	55
I - Obtention et purification des mycosides.....	55
A - Mycoside C _m	55
B - Mycoside C ₂	58
1 - Purification du mycoside C ₂ (n° 802).....	58
2 - Purification du mycoside C ₂ ("faisan").....	60

II - Méthodes d'hydrolyse.....	Pages 62
A - Hydrolyse alcaline.....	62
B - Hydrolyses acides.....	62
1 - Hydrolyse totale.....	62
2 - Hydrolyse selon Mac Lennan.....	63
3 - Hydrolyses partielles.....	63
III - Méthodes d'analyse des acides aminés sur colonne.....	63
A - Méthode de Moore et Stein utilisant le Dowex 50 x 4.....	63
1 - Préparation de la résine et confection de la colonne.....	63
2 - Préparation de l'hydrolysate.....	63
3 - Marche de la chromatographie.....	63
4 - Dosages.....	64
B - Méthode de Spackman utilisant l'Amberlites CG 120.....	64
1 - Préparation de la résine et confection de la colonne.....	64
2 - Préparation de l'hydrolysate et marche de la chromatographie.....	64
3 - Dosages.....	65
IV - Méthodes d'études des sucres.....	65
A - Réaction de Dische et Shettles.....	65
1 - Principe.....	65
2 - Mode opératoire.....	65
B - Dosage colorimétrique de Dische et Shettles.....	65
1 - Dosage des sucres totaux.....	65
2 - Dosage des sucres isolés des mycosides.....	66
C - Déméthylation.....	67
V - Réactions diverses.....	67
A - Oxydation par l'hypoiodite.....	67
B - Action de l'hydroxylamine.....	67
C - Traitement par NaBH ₄ en milieu alcalin.....	67
D - Méthylation selon la méthode de Kuhn.....	67
E - Désacétylation des mycosides.....	68
F - Dinitrophénylation des peptides selon la méthode de Sanger.....	68
G - Réaction de Dakin-West appliquée aux peptides, et glycopeptides pour la détermination de l'acide aminé C-terminal.....	68
1 - Méthode de Turner et Schmerzler.....	68
2 - Méthode de Shepherd.....	68
RESUME ET CONCLUSIONS.....	69
BIBLIOGRAPHIE.....	72

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

LES ACIDES TEICHOIQUES

Vu :
Les Membres du Jury,
CHOPIN
LEDERER
MICHEL

Vu et approuvé :
Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Vu et accordé le permis d'imprimer :
Lyon, le 6 Janvier 1965
Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
P. LOUIS

